

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



## **TESIS DOCTORAL**

**Efecto de las plaquetas en la expresión proteica de segmentos  
de aorta sana y preinflamada: un abordaje proteómico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sara González Sánchez**

**Directores**

**Antonio José López Farré  
Francisco Javier Serrano Hernando  
Guillermo Moñux Ducajú**

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**EFFECTO DE LAS PLAQUETAS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA  
DE SEGMENTOS DE AORTA SANA Y PREINFLAMADA:  
UN ABORDAJE PROTEÓMICO**

**TESIS DOCTORAL**

***SARA GONZÁLEZ SÁNCHEZ***

**Servicio de Angiología y Cirugía Vascular  
Hospital Clínico San Carlos. Madrid**

**DIRECTORES DE TESIS:**

***ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ***

***FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO***

***GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ***

**2013**





D. ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y  
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR DEL  
HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID

CERTIFICA:

Que Doña Sara González Sánchez ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“EFECTO DE LAS PLAQUETAS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE SEGMENTOS DE AORTA SANA Y PREINFLAMADA: UN ABORDAJE PROTEÓMICO”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a        de        de 2013.

D. Antonio José López Farré



**D. FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO**, DOCTOR EN MEDICINA Y  
CIRUGÍA Y JEFE DE SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR DEL  
HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID

CERTIFICA:

Que Doña Sara González Sánchez ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“EFECTO DE LAS PLAQUETAS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE SEGMENTOS DE AORTA SANA Y PREINFLAMADA: UN ABORDAJE PROTEÓMICO”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a        de        de 2013.

D. Francisco Javier Serrano Hernando



**D. GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA Y  
MÉDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR  
DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS DE MADRID**

CERTIFICA:

Que Doña Sara González Sánchez ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada **“EFECTO DE LAS PLAQUETAS EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE SEGMENTOS DE AORTA SANA Y PREINFLAMADA: UN ABORDAJE PROTEÓMICO”** con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina.

El presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo la presente certificación en Madrid a        de        de 2013.

D. Guillermo Moñux Ducajú



Esta tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores  
Antonio José López Farré, Francisco Javier Serrano Hernando y Guillermo Moñux Ducajú  
y financiada por el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social  
(Redes Temáticas de Cooperación Red Heracles RD06/0009/010 y FIS04/1205).





*A mí amigo el astronauta*

*A Luis, mamá y Daní*



## AGRADECIMIENTOS



*Largo y escabroso es el camino que del infierno lleva a la luz.* Me gustaría expresar mi agradecimiento infinito a todos aquellos que me han ayudado de alguna manera a llegar al final de este camino.

A iÑo, LaCoSaMáSbOniTDeLuNiVeRsO. A Javier Serrano, *¡chapeau!*.  
A *Willi* (o *Willy*, aún no me he enterado), por estar ahí desde el primer día. A todos los integrantes del Instituto Cardiovascular, en especial a Antonio, Javi, Dani, Petra y Begoña, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, su dedicación, trabajo y compañerismo. A Mamá, por enseñarme la importancia de ser constante. A Luis, por estar ahí siempre y para todo. A Dani, mi hermano favorito (je, je). A MiLuis, Rodrigo, Ángel, Antonio y Teresa, por ser el mejor servicio que un residente pueda soñar. A Isaquito, por aguantarme desde mi nacimiento como cirujana vascular. A Capi y Miguelit, mis mayores. A Manuelit, Aniti, Mordis y Manuela, mis *pequeñines*. A las Golden, en especial a Lola, mi fiel confidente. A Cari, por su modelo a seguir. A Iván, por esos artículos enviados. A mis compañeros de residencia. Al quirófano de la 7ª. A las enfermeras y auxiliares de la planta y a las de quirófano y a las de urgencias y las de la UVI. A mis amigos de toda la vida. A los miembros del tribunal. A los pacientes que desinteresadamente han colaborado en este estudio. A las vacas que desinteresadamente han colaborado en este estudio....

**Gracias a todos**



---

# ÍNDICE





<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. BIOLOGÍA DE LA PARED ARTERIAL.....	3
1.1.1. Anatomía de la pared arterial.....	3
1.1.1.1. <i>Capa íntima</i> .....	3
1.1.1.2. <i>Capa media</i> .....	5
1.1.1.3. <i>Capa adventicia</i> .....	5
1.1.2. Principales tipos celulares.....	6
1.1.2.1. <i>Células endoteliales</i> .....	6
1.1.2.2. <i>Células musculares lisas</i> .....	6
1.1.3. Estructura y sistema contráctil de la pared vascular.....	7
1.1.3.1. <i>Miofilamentos</i> .....	7
1.1.3.2. <i>Microtúbulos</i> .....	10
1.1.4. Metabolismo energético de la pared vascular.....	10
1.1.5. Hemodinámica y biología de la pared vascular.....	14
1.1.5.1. <i>Estrés circunferencial</i> .....	14
1.2. ARTERIOSCLEROSIS: UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA.....	14
1.2.1. Estrés oxidativo. Disfunción endotelial.....	14
1.2.2. Arteriosclerosis: formación y progresión de la placa de ateroma.....	17
1.2.2.1. <i>Inicio de la arteriosclerosis. Adhesión leucocitaria</i> .....	17
1.2.2.2. <i>Disregulación del tono vascular</i> .....	19
1.2.2.3. <i>Migración de los leucocitos</i> .....	20
1.2.2.4. <i>Transformación de los leucocitos y acumulación de lípidos</i> .....	22
1.2.2.5. <i>Progresión de la placa de ateroma</i> .....	24
1.2.2.6. <i>Rotura de la placa de ateroma</i> .....	26
1.3. FISIOLÓGÍA DE LA PLAQUETA.....	29
1.3.1. Estructura plaquetaria.....	30
1.3.1.1. <i>Glicoproteínas plaquetarias</i> .....	31
1.3.1.2. <i>Zona de los organelos</i> .....	32
1.3.2. Activación de la plaqueta.....	34
1.3.2.1. <i>Agonistas de la activación plaquetaria</i> .....	36
1.3.2.2. <i>Fases de la activación plaquetaria</i> .....	39

1.4. FUNCIÓN DE LAS PLAQUETAS MÁS ALLÁ DE LA HEMOSTASIA: INFLAMACIÓN Y ARTERIOSCLEROSIS.....	44
1.4.1. La plaqueta como productora de mediadores bioactivos.....	45
1.4.2. La plaqueta como <i>célula</i> inflamatoria.....	46
1.4.3. Interacción de la plaqueta con distintos tipos celulares.....	47
1.4.3.1. <i>Células endoteliales</i> .....	47
1.4.3.2. <i>Leucocitos</i> .....	48
1.4.3.3. <i>Células progenitoras endoteliales</i> .....	50
1.4.4. La plaqueta en el mantenimiento de la integridad vascular.....	51
1.5. PROTEÓMICA.....	51
1.5.1. Fundamentos de la técnica.....	55
1.5.1.1. <i>Preparación de las muestras</i> .....	57
1.5.1.2. <i>Primera dimensión</i> .....	58
1.5.1.3. <i>Segunda dimensión</i> .....	59
1.5.1.4. <i>Detección de las proteínas</i> .....	59
1.5.2. Análisis de la imagen.....	60
1.5.3. Espectrometría de masas.....	61
1.5.4. Futuro de la proteómica.....	63
1.5.5. La <i>era proteómica</i> en la investigación vascular.....	64
1.6. INTERACCIÓN PLAQUETA-ENDOTELIO. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	67
1.7. CONSIDERACIONES GENERALES.....	71
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>73</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>77</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>81</b>
4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	83
4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	84
4.2.1. Sangre periférica humana.....	84
4.2.2. Muestras de aorta bovina.....	84
4.3. AISLAMIENTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS.....	85
4.4. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AORTA.....	86
4.4.1. Medio de cultivo.....	86

4.4.2.	Protocolo de preincubación de las muestras.....	88
4.4.3.	Estimulación de las muestras de aorta.....	89
4.4.4.	Protocolo de coincubación (cocultivos).....	89
4.5.	DETERMINACIONES DE PROTEÍNAS MEDIANTE PROTEÓMICA.....	93
4.5.1.	Electroforesis bidimensional.....	93
4.5.1.1.	<i>Material utilizado</i> .....	94
4.5.1.2.	<i>Preparación de las muestras</i> .....	94
4.5.1.3.	<i>Primera dimensión</i> .....	96
4.5.1.4.	<i>Segunda dimensión</i> .....	100
4.5.1.5.	<i>Tinción</i> .....	101
4.5.1.6.	<i>Adquisición de imágenes y análisis</i> .....	103
4.5.2.	Espectrometría de masas.....	104
4.5.2.1.	<i>Material utilizado</i> .....	104
4.5.2.2.	<i>Método</i> .....	105
4.5.3.	<i>Western blot</i> .....	109
4.5.3.1.	<i>Material empleado</i> .....	109
4.5.3.2.	<i>Preparación de las muestras</i> .....	110
4.5.3.3.	<i>Electroforesis en gel</i> .....	111
4.5.3.4.	<i>Transferencia y bloqueo de las proteínas</i> .....	112
4.5.3.5.	<i>Detección de proteínas</i> .....	115
4.5.3.6.	<i>Análisis</i> .....	118
4.6.	DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	119
4.6.1.	Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa.....	121
4.6.2.	Triosa fosfato isomerasa.....	121
4.7.	DETERMINACIONES DEL CONTENIDO DE PIRUVATO.....	122
4.8.	ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	124

## 5. RESULTADOS

127

5.1.	CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL CITOESQUELETO Y SISTEMA CONTRÁCTIL.....	129
5.1.1.	Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta normales.....	133

5.1.2. Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$ .....	136
5.2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	138
5.2.1. Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta normales.....	140
5.2.2. Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$ .....	142
5.2.3. Cambios en la expresión proteica mediante <i>western blot</i> .....	143
5.3. DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	145
5.4. DETERMINACIONES DEL CONTENIDO DE PIRUVATO.....	147
5.4.1. Contenido de piruvato en los segmentos de aorta sana.....	147
5.4.2. Contenido de piruvato en los segmentos de aorta preinflamados.....	148
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>149</b>
6.1. MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL CITOESQUELETO Y EL SISTEMA CONTRÁCTIL.....	153
6.2. MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	157
6.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	162
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>165</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>169</b>
<b>9. APÉNDICES</b>	<b>211</b>
A. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO.....	213
B. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO.....	219
C. ABREVIATURAS.....	223
D. ABSTRACT.....	230

---

*"Reading maketh a full man;  
conference a ready man;  
but writing an exact man"*

Francis Bacon

## INTRODUCCIÓN

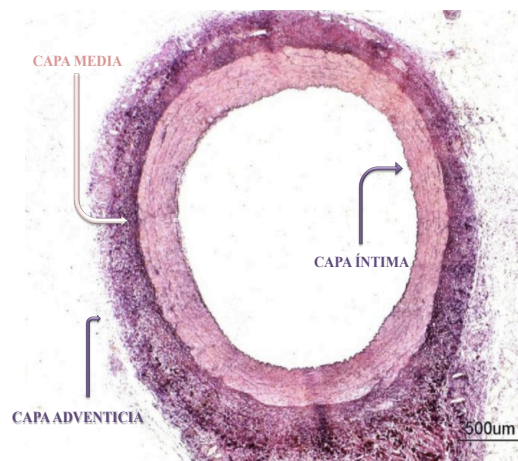


# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. BIOLOGÍA DE LA PARED ARTERIAL**

### **1.1.1. Anatomía de la pared arterial**

La pared arterial posee una estructura común en todo el árbol arterial, estando conformada por un tejido conectivo organizado en el que se incluyen células y una matriz de fibras dispuestas en tres capas: la íntima, la media y la adventicia (Fig. 1.1).



**Figura 1.1.** Anatomía de la pared vascular. Estructura de las capas íntima, media y adventicia.

#### ***1.1.1.1. Capa íntima***

La capa íntima es la capa más interna de la arteria y se extiende desde la luz del vaso hasta la lámina elástica interna. Está compuesta por el endotelio, una capa subendotelial de tejido conjuntivo y una capa elástica o fenestrada.



El endotelio está constituido por una serie de células poligonales, ovaladas o fusiformes, que se encuentran en contacto directo con el torrente sanguíneo. La superficie luminal es lisa y regular<sup>1</sup>. Esta capa constituye un revestimiento continuo con propiedades antitrombóticas debido a la existencia de una capa de glicoproteínas o glucocálix cubriendo dichas células endoteliales<sup>2</sup>. El glucocálix, además, reduce la fricción del flujo sanguíneo y sirve como barrera para evitar la pérdida de líquido a través de la pared vascular. En los procesos inflamatorios el glucocálix de las células se rompe para permitir el acceso de los leucocitos y puede ser el origen de lesiones ateroscleróticas<sup>3</sup>.

Las células endoteliales (CE) se encuentran típicamente alineadas en la dirección del flujo sanguíneo y las uniones entre ellas son de gran importancia como fuerza mecánica y para la permeabilidad de la capa. De hecho, existen zonas de unión firme entre las células, la zona *occludens* (uniones herméticas) y la zona *adherens* (uniones adherentes). Estas uniones herméticas constituyen una barrera de transporte entre las células y ayudan a mantener la polaridad de la membrana<sup>2</sup>.

Inmediatamente externa al endotelio se encuentra la lámina basal, que actúa como soporte mecánico y para la regeneración de las CE. Esta membrana posee un papel fundamental en la permeabilidad vascular, está involucrada en la formación del trombo y constituye una barrera para la migración celular<sup>4</sup>. La lámina basal está formada por glicoproteínas, moléculas de adhesión como la laminina y la fibronectina, proteoglicanos y microfibrillas de colágeno tipo IV y V<sup>5</sup>. La capa reticular subyacente al endotelio está compuesta por colágeno tipo I y III producido por las CE y las células musculares lisas (CML).

Durante el funcionamiento normal, la monocapa de endotelio se encuentra en un estado quiescente y las uniones célula-célula inhiben la proliferación, lo que resulta en un bajo índice mitótico y contribuye a la estabilidad e integridad de la pared vascular<sup>6</sup>.

### **1.1.1.2. *Capa media***

La capa media se extiende desde la lámina elástica interna hasta la adventicia. Está constituida por CML, elastina y fibras de colágeno perfectamente ordenadas<sup>7</sup>. Las capas de CML forman grupos de células con una orientación similar, rodeados por una lámina basal común en íntima relación con un entramado de fibras de colágeno tipo III. Este sistema altamente integrado implica que un elemento no puede extenderse sin extensión de otro.

### **1.1.1.3. *Capa adventicia***

La adventicia se extiende desde la lámina elástica externa hasta el tejido conectivo perivascular contiguo. Esta capa contiene los *vasa vasorum* y estructuras nerviosas, que proporcionan nutrición a la adventicia y contribuyen a la regulación de la función de la CML de la capa media, respectivamente. Las fibras vasomotoras inducen vasodilatación mediante receptores  $\beta$  adrenérgicos y vasoconstricción mediante  $\alpha$  adrenérgicos. El estímulo nervioso se transmite a las CML más externas mediante uniones neuromusculares y, posteriormente, la señal es transmitida a las más internas por señales eléctricas entre células adyacentes (Fig. 1.1).

### **1.1.2. Principales tipos celulares**

#### **1.1.2.1. *Células endoteliales***

La superficial arterial en contacto con el torrente sanguíneo, o superficial luminal, está cubierta por el endotelio, como se ha indicado con anterioridad. Las CE son muy activas metabólicamente, desempeñando un importante papel en muchas funciones fisiológicas como el control de tono vasomotor, adhesión de determinados tipos celulares, el balance hemostático, permeabilidad, proliferación y la inmunidad innata y adaptativa.

Para mantener la fluidez de la sangre, las CE expresan una serie de factores que mantienen los mecanismos de formación del trombo controlados mientras se mantenga la integridad de la pared. El carácter antitrombótico del endotelio se debe en parte a su superficie aniónica proporcionada por la alta proporción de heparán sulfato y condroitín sulfato. Las células previenen la agregación plaquetaria a través de la actividad ADP-asa de la superficie, la síntesis de prostaglandinas y la liberación de óxido nítrico (NO). El normal funcionamiento de este sistema permite un balance entre los mecanismos pro- y antitrombóticos a favor de la anticoagulación.

#### **1.1.2.2. *Células musculares lisas***

La principal función de las CML consiste en mantener una presión y flujo normales en los vasos sanguíneos mediante el control del calibre de los mismos por contracción y relajación. Son responsables de la remodelación vascular, proliferación, migración y expresión proteica. Sintetizan componentes como el colágeno, la elastina,

glicoproteínas y proteoglicanos, que contribuyen a la elasticidad de la pared vascular. Estos cambios ocurren en respuesta a situaciones crónicas, como la arterioesclerosis.

### **1.1.3. Estructura y sistema contráctil de la pared vascular**

La composición del citoesqueleto consiste principalmente en tres tipos de estructuras fibrosas: los miofilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Estas estructuras mantienen la forma y polaridad celular, así como también contribuyen a otras funciones celulares fundamentales como la motilidad, el transporte de los organelos y la mitosis<sup>8</sup>. De hecho, se ha sugerido que el citoesqueleto de actina intacto es uno de responsables fundamentales de la organización celular<sup>9</sup>, ya que constituye un resistente soporte intracelular que permite organizar importantes proteínas de membrana en la célula. Tiene la capacidad de responder a estímulos extracelulares y llevar a cabo una reorganización<sup>10</sup>. Además, algunos estudios han demostrado que numerosas proteínas solubles pueden estar asociadas al citoesqueleto<sup>9</sup>. Todos estos datos sugieren una función del mismo como regulador del medio ambiente dentro de la célula, y no sólo una mera acción estructural.

#### **1.1.3.1. Miofilamentos**

Los microfilamentos están constituidos en su mayor parte por la proteína *actina*, que constituye el 5-15% de las proteínas totales de la célula endotelial. El citoesqueleto de actina es altamente dinámico. Puede encontrarse como monómero en forma libre (actina G) o como parte de polímeros lineales denominados microfilamentos (actina F). En las células se conocen tres tipos principales de actina codificados por distintos

genes:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ <sup>10</sup>. A su vez, la actina  $\alpha$  (la más ácida) presenta cuatro isoformas: la del músculo estriado, la del miocardio, la del músculo liso vascular y la del músculo liso no vascular. Las actinas  $\beta$  y  $\gamma$  se encuentran en todas las células, musculares y no musculares.

La actina se acompaña de otras proteínas. Una de ellas es la *tropomiosina*, formada por una doble hélice de cadenas no globulares: la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$ . La función principal de la tropomiosina es bien conocida en la contracción muscular: bloquear la unión de la miosina, pero no en el propio citoesqueleto. Estudios de manipulación genética y química de proteínas han confirmado la existencia de 40 isoformas funcionalmente distintas<sup>11</sup>. Cada isoforma parece constituir un potente mecanismo de diversidad de acción de los filamentos de actina<sup>12</sup>.

Los filamentos gruesos están constituidos fundamentalmente de *miosina*, una proteína fibrilar con actividad ATPasa y, por tanto, capaz de hidrolizar el ATP en ADP y Pi (ión fosfato) y producir la contracción muscular<sup>13</sup>. La miosina está compuesta por dos cadenas pesadas idénticas y cuatro cadenas ligeras.

En la pasada década, el *dominio LIM* (denominación proveniente de las tres primeras proteínas descritas: Lin-11, Isl-1 y Mec-3) surgió como un conjunto de dominios de proteínas de diferentes características y diversas funciones. Las proteínas LIM no forman una familia funcional, aunque presentan un denominador común, que es la actuación como mediadoras de la interacción entre proteínas del núcleo y del citoplasma. Los grupos 2 y 3 son de predominio citoplasmático y están asociados con el citoesqueleto de actina<sup>14</sup>. Se ha demostrado que modulan la interacción entre las

proteínas del citoesqueleto, representando un papel en la transducción de señales y en la organización de los filamentos de actina durante determinados procesos celulares<sup>15</sup>.

Otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina son la familia de las *anexinas*. Se trata de una familia multigénica de proteínas de unión calcio-dependiente con una arquitectura única que les permite acoplarse a las membranas de manera reversible<sup>16</sup>. Se ha propuesto que las anexinas actúan como puntos de unión membrana-membrana o membrana-citoesqueleto, interviniendo en procesos de exocitosis calcio-dependiente, en algunos aspectos de procesos de endocitosis y en la estabilización de dominios específicos de la membrana de los organelos y de la membrana plasmática<sup>16</sup>. *Monastyrskaya et al*<sup>17</sup> demostraron que estas proteínas interactúan con la membrana plasmática y otras membranas de los sistemas internos de una manera coordinada. Sin embargo, otras funciones potenciales son la capacidad de unión al DNA de algunas anexinas<sup>18</sup> o la unión a nucleótidos específicos<sup>19</sup>. La anexina A1 es la que tiene una historia más larga de publicaciones de actividad extracelular. Está presente en el suero humano, especialmente en escenarios inflamatorios<sup>20,21</sup>. La anexina A2 se ha encontrado en la superficie de las células endoteliales y de los leucocitos, pudiendo actuar como receptora del plasminógeno y del tPA y actuando de modulador positivo en la cascada fibrinolítica<sup>22</sup>. Las funciones concretas de cada anexina son poco conocidas, en especial, la de las anexinas A4 y A5. Esta última parece estar relacionada con la inhibición de la coagulación sanguínea por competición con la trombina e inhibición de la actividad de la fosfolipasa A1.

La *transgelina/SM22* también es una proteína relacionada con los filamentos de actina del citoesqueleto. Esta calponina (proteína cuya función es la inhibición de

la ATP-asa de la miosina del músculo liso) se localiza en la pared vascular y en el músculo liso, siendo un marcador temprano de diferenciación del músculo liso. Aunque se desconoce su abanico de acción, parece estar relacionada con la contractilidad y se cree que presenta cierta actividad como supresora de tumores<sup>23</sup>.

#### **1.1.3.2. Microtúbulos**

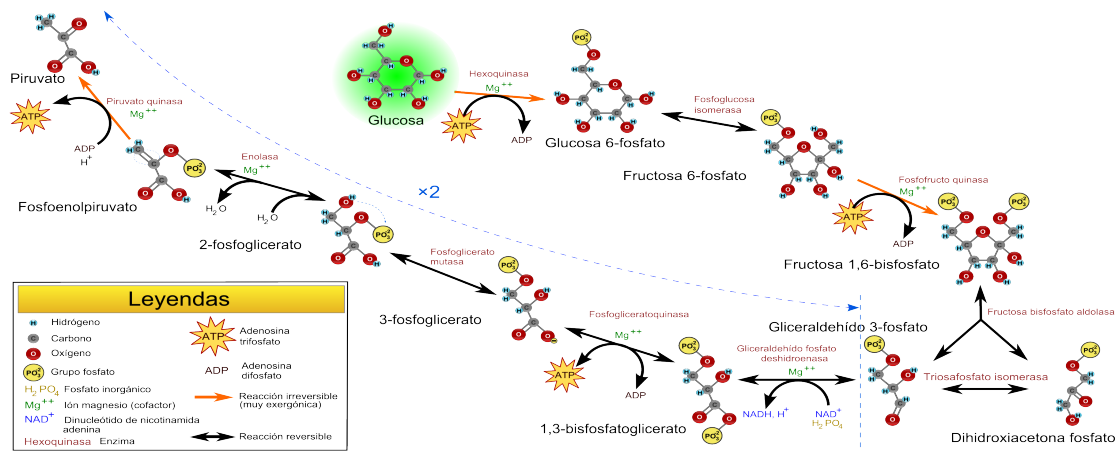
Los microtúbulos intervienen en diversos procesos celulares como el desplazamiento de vesículas, movimiento de orgánulos, transporte intracelular de sustancias y la división celular. Los microtúbulos son heteropolímeros de *tubulina  $\alpha$  y  $\beta$* . Estas proteínas se relacionan con la segregación de los cromosomas, la división celular, el mantenimiento de la forma celular y el transporte intracelular.

Se han demostrado cambios cuantitativos en los componentes del citoesqueleto como mecanismo compensatorio durante condiciones patológicas<sup>24</sup>. El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es una citoquina pleiotrópica que ha demostrado ser capaz de reducir la barrera que constituye el citoesqueleto de las CE<sup>25,26</sup> por inducción de la apoptosis<sup>27</sup> y por mecanismos no apoptóticos<sup>28</sup>, reduciendo la transcripción de las proteínas de unión intercelulares<sup>29</sup>.

#### **1.1.4. Metabolismo energético de la pared vascular**

El metabolismo energético está constituido por un conjunto de reacciones bioquímicas y procesos físicoquímicos que ocurren en la célula. Entre estos complejos procesos interrelacionados, la glucólisis constituye la principal fuente de

energía celular a través de la oxidación de la glucosa en el citosol (Fig. 1.2). Esta ruta universal consta de diez reacciones agrupadas en dos fases<sup>30</sup>:



**Figura 1.2.** Esquema de las diez reacciones que constituyen la vía glucolítica, con los sustratos, productos y enzimas catalizadoras. Fuente: [www.wikipedia.es](http://www.wikipedia.es).

### 1. Fase de gasto o aporte energético

- **Reacción 1. Fosforilación de la glucosa.** El primer paso de la glucólisis consiste en la activación de la glucosa mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP por la enzima hexoquinasa. Como consecuencia se forma la glucosa-6-fosfato (G6P).
- **Reacción 2. Isomerización de la glucosa-6-fosfato.** En esta fase la G6P se isomeriza a fructosa-6-fosfato (F6P) mediante una reacción de cuatro pasos, que implica la apertura del anillo de la G6P y posterior ciclado en la forma furanosa (F6P).



- Reacción 3. *Fosforilación de la fructosa-6-fosfato*. La fosfofructoquinasa-1 fosforila el carbono 1 de la F6P (obteniendo la fructosa 1,6-bifosfato), constituyendo éste el principal punto de control de la glucólisis debido a su irreversibilidad.
- Reacción 4. *Fragmentación de la fructosa 1,6-bifosfato*. Una enzima clave en la vía glucolítica es la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, que escinde la fructosa 1,6-bifosfato en dos triosas fosfato: la dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P).
- Reacción 5. *Isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato*. Otra enzima fundamental en el proceso de la glucólisis es la implicada en esta reacción: la triosa fosfato isomerasa (TPI). La TPI representa un importante papel en la producción de energía por la célula. Su función es isomerizar la DHAP en otra molécula de G3P.

### 2. Fase de obtención de energía

- Reacción 6. *Oxidación y fosforilación del D-gliceraldehído-3-fosfato*. Esta reacción es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, oxidando el G3P mediante la utilización de  $\text{NAD}^+$  para añadir un ion fosfato a la molécula y obteniendo el 1,3-bifosfoglicerato.
- Reacción 7. *Cesión de un grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato al ADP*. En este paso la enzima fosfoglicerato quinasa transfiere el grupo fosfato del 1,3-bifosfoglicerato a una molécula de ADP, generando así la primera molécula de ATP de la vía (y el 3-fosfoglicerato).
- Reacción 8. *Isomerización del 3-fosfoglicerato*. La enzima fosfoglicerato mutasa isomeriza el 3-fosfoglicerato procedente de la reacción anterior, dando el 2-fosfoglicerato.

- Reacción 9. *Deshidratación del 2-fosfoglicerato*. En este paso se produce una pérdida de una molécula de agua del 2-fosfoglicerato para dar lugar al ácido fosfoenolpirúvico (PEP). La enzima encargada de catalizar esta reacción es la enolasa.
- Reacción 10. *Cesión de un grupo fosfato al ADP*. La última reacción de la glucólisis es catalizada por la piruvato quinasa y da lugar al piruvato por la cesión de un grupo fosfato del PEP al ADP.

El anión piruvato es un compuesto orgánico clave en el metabolismo energético y puede seguir dos caminos: 1, si hay suficiente suministro de oxígeno, el ácido pirúvico es descarboxilado en la matriz de la mitocondria por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa rindiendo  $\text{CO}_2$  y acetil coenzima A, que es el inicio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa; 2, si no hay suficiente cantidad de oxígeno disponible, el piruvato sigue una ruta anaeróbica, la fermentación, que culmina en la producción de ácido láctico.

En el proceso metabólico de obtención de energía mediante la fosforilación oxidativa adquiere gran importancia el complejo ATP sintasa, situado en la cara interna de la membrana interna de las mitocondrias. Su función fundamental es la de sintetizar ATP a partir del ADP y un grupo fosfato y de la energía suministrada por un flujo de protones ( $\text{H}^+$ ). Esta enzima está formada por dos principales complejos, el  $\text{F}_0$  y el  $\text{F}_1$ . A su vez, el complejo  $\text{F}_1$  está formado por tres dímeros  $\alpha\beta$ . La mayor parte del sitio catalítico reside en la cadena  $\beta^{31}$ .

### **1.1.5. Hemodinámica y biología de la pared vascular**

#### **1.1.5.1. Estrés circunferencial**

El estrés normal al que está sometida la pared vascular es la presión pulsátil y el flujo variable durante el ciclo cardíaco. Las CE son las afectadas en un primer tiempo, mientras que los cambios a largo plazo, por una agresión mantenida, pueden afectar a la totalidad de la pared vascular. Las CE se van alineando en la dirección del el estrés, y cuanto mayor es el estrés, mayor es la elongación de las células<sup>32,33</sup>. Estos cambios producen una redistribución de las fibras intracelulares así como variaciones de la cantidad. En áreas sometidas a gran estrés, las CE expresan mayores cantidades de actina, miosina y otras proteínas del sistema contráctil.

### **1.2. ARTERIOESCLEROSIS: UNA ENFERMEDAD INFLAMATORIA CRÓNICA**

#### **1.2.1. Estrés oxidativo. Disfunción endotelial**

Diferentes estudios han asociado al estrés oxidativo en la patogenia de muchas enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión, la arteriosclerosis y la insuficiencia cardíaca congestiva. Esta situación es causada por un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo (del inglés ROS), que incluyen los radicales libres de oxígeno y los peróxidos, y la capacidad de detoxificar rápidamente los reactivos inmediatos o reparar el daño resultante. Durante el metabolismo aerobio se generan constantemente pequeñas cantidades de ROS, incluyendo radicales hidroxilo, aniones superóxido y peróxido de hidrógeno, como respuesta a estímulos internos y externos. Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser

indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (proliferación celular, apoptosis...), la inmunidad y la defensa contra organismos. Todas las células mantienen un entorno reductor gracias a enzimas que sostienen este estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Las fuentes de ROS incluyen componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial-xantina oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, hemooxigenasa, NADH/NADPH oxidasa y NO sintasa. Altas dosis o una eliminación inadecuada de ROS dan lugar a una situación de estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daños en macromoléculas biológicas. Por ello, es necesario que se mantenga un estricto equilibrio en los niveles sistemas antioxidantes enzimáticos y varios tipos de mediadores (factores de crecimiento, prostaglandinas y NO). Entre las enzimas antioxidantes destacan la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y catalasa y el glutatión.

La producción de ROS es una alteración comúnmente asociada a la arteriosclerosis. Bajo una situación de estrés oxidativo, la vida media del NO se reduce y la formación del anión peroxinitrito induce una peroxidación lipídica, disrupción de las membranas celulares, la señalización y la supervivencia celular<sup>34,35</sup>.

La *disfunción endotelial* se considera una de las primeras manifestaciones de las enfermedades cardiovasculares, en especial la arteriosclerosis. Como se ha mencionado con anterioridad, el endotelio no es una mera capa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, sino una estructura altamente especializada, metabólicamente activa, que regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células de la propia pared, ejerciendo un papel clave como sensor y

transmisor de señales. Diversos factores pueden producir una modificación en las funciones del endotelio y provocar lo que se ha denominado disfunción endotelial.

La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular y que puede facilitar el desarrollo de arterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis<sup>36,37,38</sup>.

El endotelio permite un tráfico selectivo de macromoléculas, pero cuando se produce este desequilibrio se observa una pérdida progresiva para controlar el paso de determinadas macromoléculas hacia el interior, como el fibrinógeno y las proteínas de baja densidad (LDL). Este incremento en la permeabilidad parece vinculado con un proceso de contracción celular mediado por calcio y con una desorganización del citoesqueleto celular<sup>39</sup>.

El paso de LDL a través del endotelio se produce a favor de gradiente de concentración mediante un proceso de transcitosis no mediado por receptor<sup>40</sup>. Se cree que la desorganización de las fibras de actina y la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina es el efecto que facilita este tránsito<sup>41</sup>.

La disfunción endotelial implica una alteración profunda de su patrón de expresión génica, lo que conlleva la inducción de genes que, en condiciones fisiológicas, estarían reprimidos y la inhibición de otros expresados en condiciones

normales<sup>39</sup>. En este sentido, se produce una diferente modulación de la expresión proteica de las células endoteliales.

### **1.2.2. Arteriosclerosis: formación y progresión de la placa de ateroma**

#### **1.2.2.1. Inicio de la arteriosclerosis. Adhesión leucocitaria**

El inicio y progresión de la arteriosclerosis están caracterizados por la acumulación de monocitos y linfocitos-T en la pared arterial. La activación del endotelio conlleva la expresión/secreción de citoquinas, como la interleuquina 1 (IL-1), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el fibroblástico básico (bFGF) y los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para monocitos [MCP-1]), y la exposición de proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes<sup>42,43</sup>. Los grupos de moléculas más importantes de CAM implicados en este proceso son las selectinas (denominadas así por su similitud con la familia de las lectinas) y la superfamilia de las inmunoglobulinas. Mientras que las selectinas median en la adhesión transitoria de los leucocitos con el endotelio, las inmunoglobulinas median en una unión más sostenida. Dentro de las selectinas destaca el papel de la P-selectina, la cual parece estar involucrada en procesos iniciadores de aterogénesis, ya que está sobreexpresada en placas de ateroma humanas<sup>44</sup>. Dentro de las inmunoglobulinas destaca la VCAM-1 (molécula de adhesión vascular -1), una molécula de adhesión endotelial-leucocitaria que parece ser una de las principales moléculas para la adhesión temprana de leucocitos al endotelio arterial en lugares de iniciación de la placa de ateroma<sup>45</sup>. Distintos estudios en animales muestran que la VCAM-1 se expresa temporalmente

en sitios de formación de lesiones ateromatosas, como ocurre en conejos alimentados con una dieta rica en colesterol y en ratones deficientes en apolipoproteína E<sup>46,47</sup>.

El proceso de adhesión comienza con el deslizamiento de los leucocitos por la superficie endotelial, la posterior adhesión y, finalmente, la trans migración. La fase de rodamiento y adhesión es el resultado de una interacción específica entre los leucocitos y las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio. El evento desencadenante de la expresión de receptores linfocitarios en las CE es la acumulación de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LDL<sub>ox</sub>). Estas LDL<sub>ox</sub> parecen ser uno de los factores proinflamatorios más importantes durante los procesos arterioscleróticos<sup>48</sup>. El efecto proinflamatorio de las moléculas de LDL<sub>ox</sub> implica la aparición de peróxidos y otra serie de radicales libres. Las LDLox junto con aldehídos de cadena pequeña y citoquinas proinflamatorias como la IL-1 son capaces de producir una alteración profunda en el patrón de expresión génica de las CE, lo que conlleva la inducción de genes que en condiciones fisiológicas estarían inhibidos (Fig. 1.3). En los últimos años se han acumulado evidencias que subrayan la relevancia del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) como común denominador en la expresión coordinada de genes inducidos por estas moléculas proinflamatorias<sup>49,50</sup>. El NF- $\kappa$ B posee un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria e inmunitaria, controlando la transcripción de genes que codifican para multitud de moléculas como interleuquinas (IL-1, IL-6 e IL-8), el TNF- $\alpha$ , factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos (G-CSF, M-CSF, GM-CSF), varias moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1)<sup>51</sup>, antígenos de clase II y anticuerpos<sup>52,53</sup>.



**Figura 1.3.** Esquema de los procesos iniciadores de la aterogénesis.

#### 1.2.2.2. *Disregulación del tono vascular*

El NO, sintetizado por el endotelio, es una de las molécula que puede clasificarse como ateroprotectora, ya que posee un efecto vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de las CML, antioxidante e inhibidor de la expresión de las CAM (IL-1 e interferón  $\gamma$  [INF- $\gamma$ ]<sup>54</sup>) y de la adhesión de monocitos a la pared arterial. A nivel transcripcional, el NO induce la expresión de I $\kappa$ B, el inhibidor endógeno de NF- $\kappa$ B, inhibiendo los efectos proinflamatorios de NF- $\kappa$ B. Por ello, al ser una molécula clave en numerosos procesos homeostáticos locales, cuando se produce una alteración en su producción se favorece el desarrollo de lesiones arterioscleróticas.

La traducción más temprana de un endotelio disfuncionante es la disminución de la capacidad vasodilatadora, como se ha demostrado en pacientes con diversos



factores de riesgo cardiovascular<sup>55</sup>. Se piensa que la oxidación de moléculas de LDL puede ser modulada por el NO y sus productos. A su vez, las LDL<sub>ox</sub> pueden inhibir la producción de NO por diferentes mecanismos: 1, disminución de la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), como se ha demostrado en estudios *in vitro*<sup>56</sup>; 2, aumento de la degradación del NO<sup>57</sup>; 3, aumento de la fracción de eNOS unida a caveolina (por tanto, insensible a la regulación por calcio-calmodulina<sup>58</sup>). La importancia *in vivo* de estos mecanismos de disminución del NO se demuestra por la menor expresión de la eNOS en lesiones arterioscleróticas<sup>59</sup>.

En condiciones de flujo laminar, las CE están sometidas a un estrés continuo que promueve una actividad continua de la eNOS, produciendo una síntesis basal de NO. Diferentes autores afirman que esta producción basal de NO protegería al endotelio ante estímulos aterogénicos. Por el contrario, en aquellas zonas en las que existe un flujo turbulento, como en las bifurcaciones arteriales, se produciría una alteración en la actividad de la eNOS, predisponiendo a estas zonas a la formación de una lesión arteriosclerótica. Esta teoría podría explicar por qué las zonas de ramificación arterial están más predispuestas a la formación de placas de ateroma<sup>60,61</sup>.

### **1.2.2.3. Migración de los leucocitos**

Como se ha mencionado con anterioridad, la actividad inflamatoria desencadenada por la acumulación de LDL<sub>ox</sub> estimula en las CE la producción de distintas moléculas proinflamatorias, como la ICAM-1, VCAM-1, P-selectina o E-selectina. El rodamiento representa la interacción entre los leucocitos y las selectinas, con la consiguiente adhesión, en la que toman parte las inmunoglobulinas (ICAM y

VCAM). La sobreexpresión de las CAM, junto con la inducción de sustancias quimioatrayentes como la MCP-1, facilita la unión y la migración de los monocitos al espacio subendotelial<sup>62,63</sup>. La consecuencia final es una acumulación de monocitos en la pared vascular secundaria a la situación proinflamatoria. Otras moléculas de adhesión importantes incluidas en los monocitos incluyen integrinas, la Mac-1 (CD11b/CD18) o el antígeno muy tardío 4 y la molécula celular 1 de adhesión a plaquetas/endotelio.

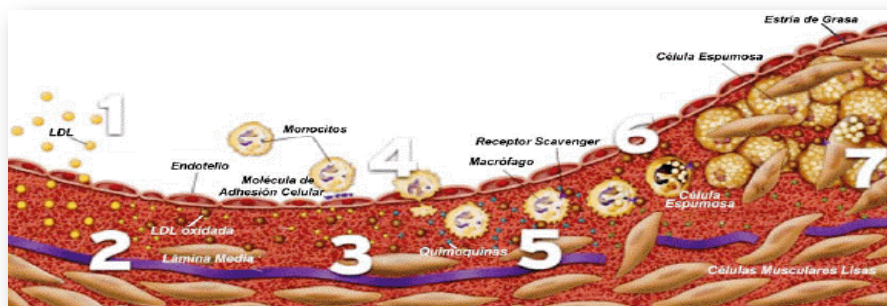
Otras moléculas de la superfamilia de la C-X-C quimioquinas, como la IL-8, el factor de crecimiento regulador de oncogenes (GRO), el IFN- $\gamma$  o el factor plaquetario 4 (PF4), son ampliamente reconocidas como predominantes quimioatrayentes de neutrófilos y/o linfocitos<sup>64,65</sup>. *Boisvert et al*<sup>66</sup> demostraron que la IL-8 posee un papel fundamental en la localización de los macrófagos en las lesiones arterioscleróticas y su progresión. La eotaxina es una quimioquina CC cuya sobreexpresión en estas lesiones se relaciona con el reclutamiento de mastocitos<sup>67</sup>.

Estudios previos han demostrado la presencia de linfocitos T CD4+ e IFN- $\gamma$  tanto en lesiones arterioscleróticas humanas como de ratón<sup>68</sup>. El IFN- $\gamma$  posee un papel crítico en la modulación de la respuesta inmune estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias (IP-10, MIG, I-TAC y citoquinas CXC), moléculas de adhesión en las células endoteliales, CML y macrófagos. El IFN- $\gamma$  también estimula la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en las CML, activando a más linfocitos T y macrófagos y produciéndose así un *feed-back* positivo. Por tanto, una vez reclutados, los linfocitos pueden perpetuarse y amplificar la respuesta inflamatoria inicial.

#### 1.2.2.4. Transformación de los leucocitos y acumulación de lípidos

En los últimos años, el importante papel de la inflamación en la arteriosclerosis se ha centrado en el sistema inmune. La inmunidad innata representa el primer paso en la respuesta inflamatoria y está basada en los macrófagos y las células dendríticas<sup>69</sup>. Una vez los monocitos reclutados pasan al espacio subendotelial de la pared arterial adquieren las características morfológicas de los macrófagos y posteriormente sufren una serie de cambios que les llevan a la formación de *células espumosas*. En el desarrollo de la arteriosclerosis, los receptores más importantes para la inmunidad innata son los llamados receptores *scavenger* y los *toll-like receptors* (TLR)<sup>70</sup>. *Rosenfeld et al*<sup>71</sup> demostraron la expresión de mRNA y la presencia de factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) en lesiones ateroscleróticas en humanos y conejos. El M-CSF es una glicoproteína expresada por distintos tipos celulares como monocitos y macrófagos, CE, fibroblastos y linfocitos<sup>72,73,74,75</sup> y constituye una de las principales moléculas en la transformación de los monocitos. En un primer tiempo, los receptores *scavenger* SR-A y CD-36 son los responsables del reclutamiento de las LDLox y la transformación de los macrófagos en células espumosas<sup>76,77</sup>. Además, se produce la activación del NF-κB, lo que desencadena un potente ciclo quimioatrayente de monocitos y formación de macrófagos/células espumosas (MCP-1, leucotrieno LTB4). El M-CSF aumenta la expresión de receptores *scavenger* SR-A, citoquinas y factores de crecimiento, promoviendo la diferenciación y proliferación de las células espumosas<sup>78</sup>. Junto con el incremento de SRA se produce un aumento en la expresión de CD36, lo que favorece la internalización por los monocitos de las lipoproteínas modificadas como ésteres de

colesterol de compartimentos celulares. Finalmente, estos macrófagos cargados de lípidos se denominan células espumosas y son característicos de las lesiones arterioscleróticas. A su vez, estos macrófagos modificados producen citoquinas que activan a las CML circundantes, resultando en formación de colágeno y fibrosis<sup>79</sup> (Fig. 1.4).



**Figura 1.4.** Etapas de la formación de la placa arteriosclerótica. 1 y 2, entrada de las lipoproteínas en el espacio subendotelial y oxidación. 3, 4 y 5, liberación de factores de crecimiento y citoquinas que promueven la diapédesis de monocitos y su diferenciación en macrófagos. 6, formación de células espumosas por la internalización de lipoproteínas modificadas y oxidadas. 7, establecimiento de la estría grasa por la acumulación de células espumosas (Modificado de *Faxon et al*<sup>80</sup>).

El factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) también puede promover la inflamación en las lesiones arterioscleróticas, ya que ayuda a la supervivencia de fagocitos mononucleares que contienen mieloperoxidasa (MPO). La MPO es una enzima que da lugar a un aumento de un ácido prooxidante, el ácido hipocloruro, el cual es una importante fuente de estrés oxidativo e inflamación en la placa de ateroma humana<sup>81</sup>.

*Schönbeck et al*<sup>82</sup> demostraron la implicación del CD40 y su ligando CD40L (CD154) tanto en los estadios iniciales de la arteriosclerosis como en el desarrollo de lesiones avanzadas. El CD40 ligando no sólo está presente en los linfocitos B, sino

también en los monocitos, macrófagos y CE, sugiriendo una amplia función *in vivo*. Henn *et al*<sup>83</sup> demostraron la expresión de CD40L en las plaquetas a los pocos segundos de su activación *in vitro* y durante la formación del trombo *in vivo*. Del mismo modo que el TNF- $\alpha$  y la IL-1, el CD40L en las plaquetas induce la secreción de quimioquinas por las CE y la expresión de moléculas de adhesión para el reclutamiento y extravasación de leucocitos en la zona de la lesión. Estos resultados indican que las plaquetas no sólo están implicadas en la hemostasia, sino directamente en la iniciación de la respuesta inflamatoria en la pared arterial.

La inmunidad adaptativa es mucho más específica que la innata, pero puede tardar de días a semanas hasta estar completamente desarrollada. Se basa en la generación de receptores de linfocitos T y B e inmunoglobulinas que reconocen antígenos en la placa de ateroma. La inmunidad adaptativa constituye la base de grandes avances en el futuro cercano, como la inmunización y el desarrollo de fármacos inmunosupresores.

#### **1.2.2.5. Progresión de la placa de ateroma**

Solo las CE, los macrófagos y algunas células T participan en el desarrollo de la estría grasa, la lesión arteriosclerótica más temprana y asintomática. La exposición continua a factores de riesgo crea un ambiente proaterogénico que produce un incremento mayor de la quimiotaxis de monocitos y por tanto una mayor acumulación de lípidos en la placa. En el progreso de la enfermedad, la respuesta inmunoinflamatoria se asocia a una respuesta inmunoproliferativa mediada por las CML, que son las encargadas de la reparación del daño arterial. Como ocurre habitualmente, el estímulo

se mantiene durante el curso de años, con lo que la respuesta *reparadora* puede hacerse muy voluminosa, ir invadiendo el lumen de la arteria y, finalmente, producir un cuadro de isquemia del territorio afectado<sup>84</sup>. Sin embargo, las CML y la matriz extracelular de colágeno que producen confieren estabilidad a las placas, protegiéndolas contra complicaciones como la rotura y trombosis<sup>85</sup>.

Cuando se produce la descamación de CE vasculares las plaquetas se adhieren a la lesión, activándose y degranulando sustancias fibrogénicas, como el PDGF, promoviendo la proliferación de CML y la acumulación de matriz extracelular<sup>86,87</sup>. El PDGF aumenta la síntesis de colágeno y con ello se favorece un aumento de la capa fibrosa de la placa de ateroma. Los leucocitos infiltrados en la lesión y las CE también pueden producir PDGF. Las plaquetas también son capaces de sintetizar factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), el cual también fomenta la proliferación de CML y la producción de colágeno intersticial.

Durante la progresión de la arteriosclerosis, las CE, los macrófagos y las CML van muriendo por apoptosis o necrosis. La apoptosis contribuye a la acción del factor tisular (TF) y a la trombogenicidad del *core* lipídico de la placa<sup>88</sup>.

La calcificación focal en las placas de arteriosclerosis es muy común y se incrementa con la edad<sup>89</sup>. En los procesos de mineralización están implicadas las CML vasculares<sup>90</sup>, debido a su capacidad para producir osteopontina, una proteína involucrada en la formación de hueso y la mineralización<sup>91,92</sup>. Miembros de la familia del factor transformante también pueden favorecer la mineralización de la placa<sup>93</sup>.

#### **1.2.2.6. Rotura de la placa de ateroma**

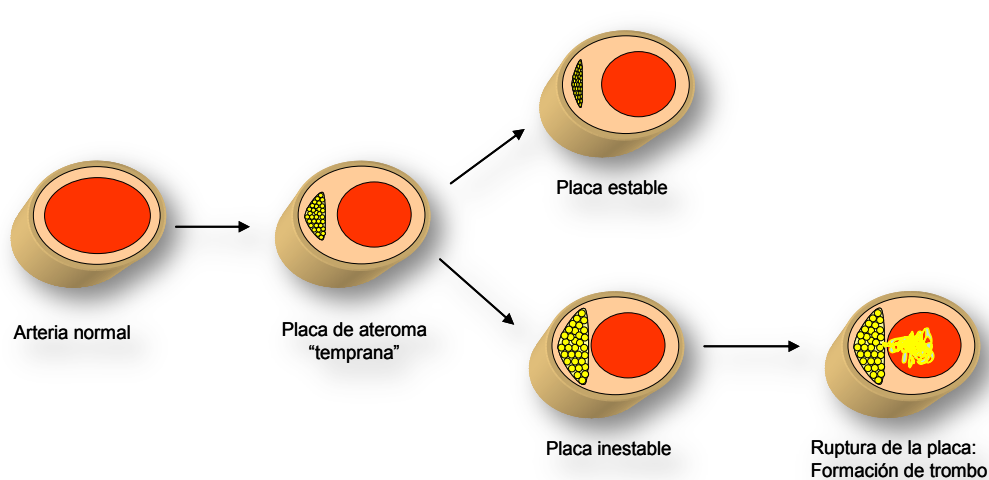
La rotura de una placa de ateroma, y la consiguiente trombosis, es la responsable del inicio de muchos síndromes isquémicos agudos. Existen dos mecanismos que independientemente o en conjunción determinan la rotura de la placa. El primero está relacionado con fuerzas físicas y acontece más frecuentemente cuando la capa fibrosa es más fina y cuando está más intensamente infiltrada por células espumosas. El segundo mecanismo se relaciona con la actividad intraplaca de los macrófagos<sup>94</sup> y mastocitos<sup>95</sup>, que degradan la matriz extracelular por fagocitosis o liberación de enzimas proteolíticas (por ejemplo, metaloproteasas). Por tanto, se ha considerado que la composición y el estado de la placa, más que el grado de estenosis, son los principales responsables de la enfermedad aterotrombótica<sup>96,97,98</sup>.

En las últimas décadas se han observado importantes avances en el estudio de los eventos isquémicos agudos, considerándose un factor muy importante el estudio de la lesión precursora de la trombosis. La interrupción del flujo sanguíneo en la arteria enferma puede producirse por tres mecanismos distintos<sup>99</sup>, como se observa en la Figura 1.5:

Primero, la erosión de la placa, definida como la formación aguda de trombo en contacto directo con la matriz de proteoglicanos en un área carente de endotelio. Finalmente, esto provoca la adhesión y activación plaquetaria y promueve, por tanto, la formación del trombo<sup>100</sup>.

Segundo, la trombosis o hemorragia intraplaca. Existe una exuberante formación de microvasos en las placas de ateroma, probablemente inducida por el mismo proceso inflamatorio<sup>101</sup>. Una hemorragia intraplaca produce un aumento en la deposición de fibrina y hemosiderina y la trombosis *in situ* conduce a la generación de trombina, que, junto con el fibrinógeno adherido, puede estimular la migración y progresión del músculo liso. La trombina produce activación plaquetaria estimulando la liberación de factores de crecimiento contenidos en los gránulos  $\alpha$  plaquetarios, como PDGF y TGF- $\beta$ .

Y en tercer lugar, la rotura de la capa fibrosa de la placa, que es el mecanismo más común de interrupción del flujo sanguíneo y desarrollo de un evento isquémico agudo. Estas placas poseen una escasa capa (incluso ausencia) de CML y un núcleo necrótico cubierto por una fina capa fibrosa infiltrada por macrófagos activados, que producen metaloproteinasas de matriz. Se trata de placas vulnerables con alto riesgo de rotura.



**Figura 1.5.** Proceso de desarrollo de la placa de ateroma, tipos de placas y sus complicaciones.



También están asociados fenómenos de apoptosis en la rotura de la placa de ateroma. *Cai et al*<sup>102</sup> demostraron que la apoptosis regulada por FAS/APO 1 está involucrada en el desarrollo de lesiones arterioscleróticas avanzadas y que probablemente determine el acúmulo de masa en los vasos enfermos. La apoptosis dentro de la placa de ateroma compromete a todas las líneas celulares, pero con un gran predominio de los macrófagos<sup>103</sup>. Estas células apoptóticas favorecen el reclutamiento de otras células inflamatorias y, por tanto, también contribuyen a todo el proceso inflamatorio. *Mallat et al*<sup>104</sup> demostraron la íntima asociación entre apoptosis e inflamación, coexistiendo ambos procesos en áreas de rotura de la placa. Estos mismos investigadores también encontraron niveles elevados de micropartículas de membrana procedentes de células apoptóticas en la placa arteriosclerótica<sup>105</sup> y cantidades elevadas de micropartículas de membrana con potencial procoagulante en sangre periférica.

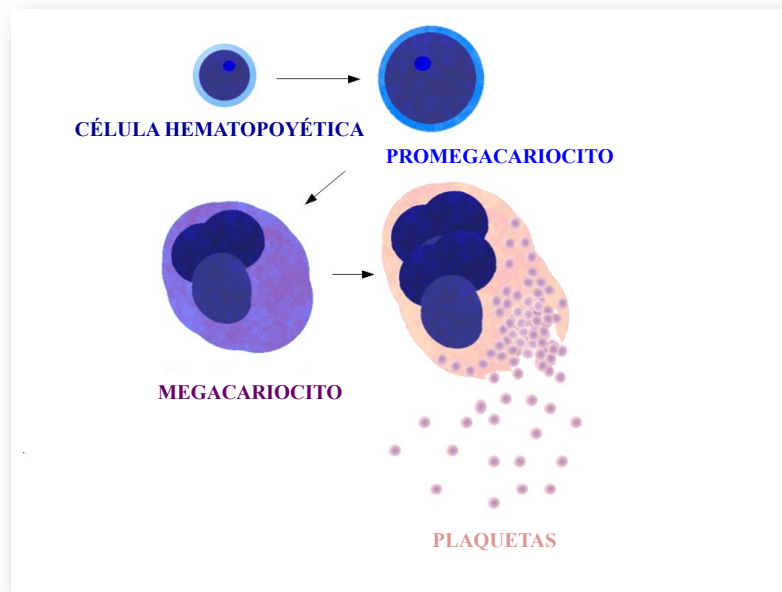
Cuando se produce la rotura de la placa, queda expuesto el *core* lipídico, altamente trombogénico por su contenido en TF. Por tanto, el TF es un elemento clave en la iniciación de la cascada de la coagulación, siendo esencial en la trombosis que sigue a la disrupción de la placa. La actividad es muy dependiente de la presencia de la fosfatidilserina, un fosfolípido aniónico que se redistribuye en la superficie de la membrana celular durante la muerte por apoptosis, confiriendo un potencial trombogénico a la célula apoptótica (principalmente los macrófagos). La mayoría del TF expresado dentro de la placa de ateroma se ha encontrado en áreas de alta densidad de células apoptóticas y de micropartículas<sup>106</sup>. Además de activar la cascada de la coagulación, el TF activa consecuentemente a las plaquetas circulantes y a los

leucocitos, tanto neutrófilos como monocitos<sup>107,108</sup>, que interactúan llevando a la formación del trombo<sup>109</sup>.

Además, moléculas de CD40-L unido a las plaquetas son capaces de incrementar aún más el estado proinflamatorio y protrombótico. Incluso en ausencia de fisuras en la placa, las citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) pueden potenciar las propiedades procoagulantes de las CE y de los neutrófilos y contribuir así a las complicaciones trombóticas de la placa de ateroma<sup>110</sup>.

### 1.3. FISIOLÓGÍA DE LA PLAQUETA

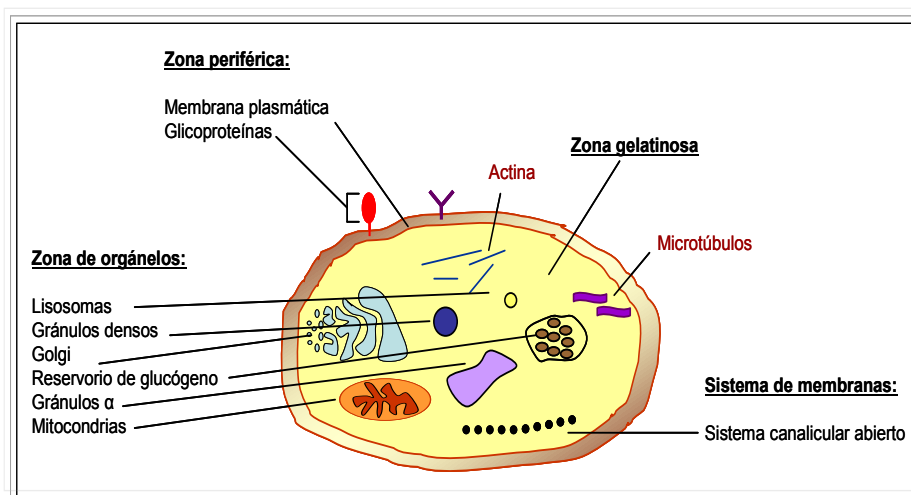
Las plaquetas son fragmentos citoplásmicos pequeños (2-4 x 0.5  $\mu$ m de diámetro), discoides<sup>111</sup> y carentes de núcleo derivados de los megacariocitos, sus células precursoras de la médula ósea<sup>112</sup>. Son los segundos corpúsculos más numerosos del torrente circulatorio (150-450 x 10<sup>9</sup>/l). El volumen plaquetario medio (VPM) es de 7,06  $\pm$  4,85 fl; este VPM aumenta siempre que existe una mayor demanda de trombopoyesis, como ocurre en situaciones de trombocitopenia, y disminuye con la edad de las plaquetas. La producción de plaquetas desde los megacariocitos de la médula ósea está regulada por una sustancia llamada trombopoyetina<sup>113</sup>, que parece tener un papel importante en la reversión de la trombocitopenia (Fig. 1.6). El 70% de las plaquetas están en circulación y el 30% restante se localiza en el bazo.



**Figura 1.6.** Sistema de producción de plaquetas. Fuente: internet.

### 1.3.1. Estructura plaquetaria

Las plaquetas son estructuras morfológicamente muy sencillas, a pesar de que su actividad fisiológica es extraordinariamente compleja (Fig. 1.7). Con microscopía electrónica se reconocen cuatro zonas en su estructura: la *zona periférica* (membrana plasmática y diversas glicoproteínas), la *zona gelatinosa* (formada por la matriz citoplasmática), la *zona de los organelos* (mitocondrias, ribosomas, aparato de Golgi y diversos tipos de gránulos) y por último el *sistema de membranas* (formado por un sistema de canalículos y túbulos densos que le confieren a la plaqueta una estructura esponjosa).



**Figura 1.7.** Estructura y composición de la plaqueta.

### 1.3.1.1. *Glicoproteínas plaquetarias*

La clasificación de las glicoproteínas plaquetarias se basa en su movilidad electroforética. Actualmente se utilizan nuevos sistemas de nomenclatura debido a que se han encontrado proteínas idénticas a las plaquetarias en otros tipos celulares. Estos nuevos sistemas incluyen las denominaciones VLA (antígenos tardíos), MEC (matriz extracelular) y AD (acúmulos de diferenciación). Entre las distintas glicoproteínas plaquetarias destacan:

#### - Glicoproteína plaquetaria Ib

La glicoproteína Ib (GPIb) se encuentra localizada en la superficie externa de la membrana plaquetaria, siendo responsable de la carga negativa de la superficie. Existen aproximadamente 25.000 moléculas por plaqueta. La GPIb constituye un punto clave en el proceso de formación del trombo, ya que forma parte de la porción

principal del sitio de unión para el factor de *von Willebrand* (vWF) durante la adhesión de las plaquetas al subendotelio. El complejo Ib tiene cuatro subunidades diferentes (GPIb- $\alpha$ , GPIb- $\beta$ , GPIb-IX y GPIb-V).

- **Glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa**

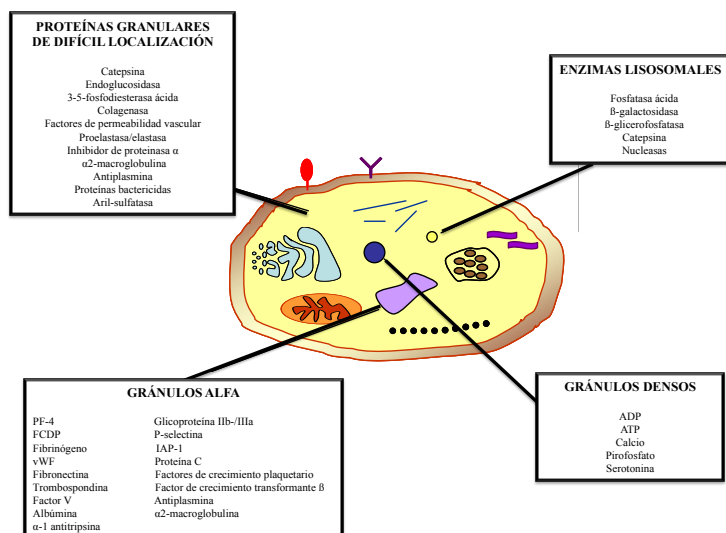
La glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), también llamada integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , es una integrina heterodimérica que se encuentra en la superficie de la plaqueta. Constituye el 2% de las proteínas plaquetarias totales, conteniendo aproximadamente 80.000 complejos en su superficie cuando están en reposo y en menor cantidad en la membrana de los gránulos  $\alpha$ . Las subunidades  $\alpha$  (GPIIb) y  $\beta$  (GPIIIa) son productos de genes diferentes. El complejo IIb/IIIa funciona como receptor del fibrinógeno y del vWF sólo después de la activación de la plaqueta, tras un cambio conformacional.

- **Glicoproteína plaquetaria Ia/IIa**

Es la glicoproteína receptora para el colágeno tipo I y tipo III<sup>114</sup>, fundamental en la adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial.

**1.3.1.2. Zona de los organelos**

Las plaquetas contienen en la zona de los organelos cuatro tipos de gránulos de almacenamiento: los gránulos densos, los gránulos  $\alpha$ , los lisosomas y las proteínas granulares de difícil localización (Fig. 1.8).



**Figura 1.8.** Tipos de gránulos plaquetarios y su composición.

Los *gránulos  $\alpha$*  contienen una serie de proteínas específicas de la plaqueta, cuya lista aún continúa creciendo<sup>115</sup>. Se incluyen varias proteínas: 1, de adhesión, como el vWF o la trombospondina; 2, plasmáticas, como inmunoglobulinas y albúmina; 3, mitógenos celulares, como los factores de crecimiento plaquetarios y el TGF- $\beta$ ; 4, factores coagulantes, como el factor V; 5, inhibidores de las proteasas, como la  $\alpha$ 2 macroglobulina y la  $\alpha$ 2 antiplasmina. Más recientemente se demostró que la membrana interna de los gránulos  $\alpha$  contenían importantes receptores fisiológicos, como la glicoproteína IIb/IIIa y la P-selectina. El destino del contenido granular es su liberación durante la activación plaquetaria en los sitios de daño de la pared vascular, desarrollando un importante papel en la hemostasia, inflamación, reparación de la pared vascular y, por tanto, en la patogenia de la arteriosclerosis<sup>116</sup>.

Los *gránulos densos* contienen nucleótidos de adenina, principalmente bajo la forma de ADP y ATP. Forman un complejo junto con iones de calcio y pirofosfato,

no siendo intercambiables con los nucleótidos que están implicados en el metabolismo general de la célula<sup>117</sup>. También se encuentra almacenada una gran cantidad de serotonina que actúa de forma sinérgica con otros agentes para activar a las plaquetas y modular el tono y la integridad vascular<sup>118</sup>.

Los *lisosomas* se caracterizan por su contenido rico en enzimas hidrolíticas, principalmente hidrolasas ácidas, fosfatasa ácida,  $\beta$ -galactosidasa y distintos tipos de nucleasas.

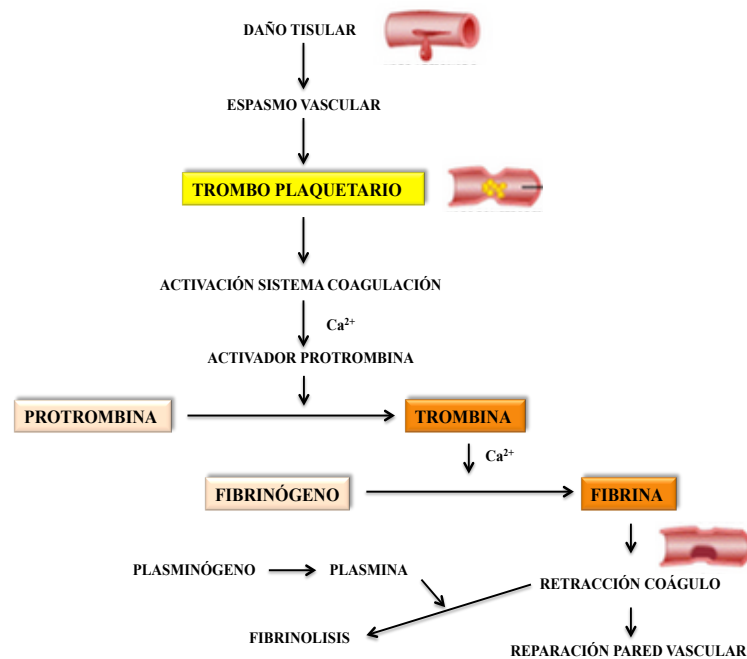
Probablemente la secreción de los gránulos de las plaquetas se produce mediante la fusión del gránulo con las membranas del sistema de conexión a la superficie, proceso para el que es necesaria la presencia de iones calcio y de una fosfolipasa dependiente de calcio.

### 1.3.2. Activación de la plaqueta

En condiciones fisiológicas la función de las plaquetas es mantener la integridad de la pared vascular, evitando alteraciones de la permeabilidad vascular<sup>119</sup>. La hemostasia se consigue a través de la interacción de tres sistemas biológicos fundamentales: la pared vascular, las plaquetas y las proteínas de la cascada de la coagulación sanguínea.

Como se ha mencionado anteriormente, la superficie endotelial inhibe la activación plaquetaria mediante la producción de diferentes sustancias. Cuando se produce una disrupción del endotelio se genera una respuesta contráctil de la pared

vascular y, al mismo tiempo, se produce una adhesión de las plaquetas al subendotelio (Fig. 1.9). En este sentido, el colágeno tiene un papel fundamental por tratarse de uno de los agonistas más intensos de la activación plaquetaria.



**Figura 1.9.** Esquema de la formación del trombo plaquetario y del proceso de reparación vascular.

Cuando son expuestas a los diferentes agonistas, las plaquetas presentan diferentes respuestas, que se encuentran íntimamente asociadas *in vivo*, pero que *in vitro* pueden ser estudiadas separadamente: la adhesión y cambio de forma, la agregación y la secreción de sustancias procoagulantes<sup>120</sup>. En las fases más avanzadas, se libera ácido araquidónico, que es transformado en prostaglandinas y tromboxanos (potentes agonistas e inductores de la agregación y la secreción plaquetaria). Por tanto, se produce un *feed-back* positivo que resulta de las interacciones entre los receptores de superficie plaquetarios y sus correspondientes agonistas.



### 1.3.2.1. *Agonistas de la activación plaquetaria*

Las plaquetas pueden ser activadas por un gran número de sustancias, a las cuales reaccionan en pocos segundos. La activación plaquetaria comprende : 1, la formación y liberación de sustancias vasoactivas o agonistas plaquetarios que favorecen el proceso de agregación, induciendo a su vez la activación de otras plaquetas (reacción en cascada) y 2, la activación de receptores de proteínas en la membrana plaquetaria, entre los que se encuentra el responsable de la fijación de las plaquetas a la zona lesionada (factor de *von Willebrand*) y, el más importante, el receptor GPIIb/IIIa, que reconoce y fija las cadenas de fibrinógeno, formando la trama final del tapón hemostático.

Los agonistas plaquetarios actúan fundamentalmente por tres mecanismos: liberación de ADP, generación de endoperóxidos e ionosfera de calcio y acción de la trombina. Entre los múltiples agonistas que intervienen en el proceso de activación plaquetaria destacan:

#### - **Adenosín difosfato (ADP)**

El ADP plaquetario se encuentra localizado fundamentalmente en los gránulos densos, aunque también existe en el citosol y unido a la actina-F. El ADP liberado desde el endotelio dañado o secretado por plaquetas previamente activadas induce agregación por reacción con los receptores de membrana. La exposición al ADP produce un rápido influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  e inhibición de la adenilciclase, causando el cambio

de forma de la plaqueta, la activación del receptor del fibrinógeno, agregación y secreción<sup>121</sup>. Los efectos del ADP en las plaquetas son mediados por tres subtipos de receptores P2. Según *Kunapuli et al*<sup>122</sup>, un receptor está acoplado por Gi a la inhibición de la adenilciclase (P2TAC), otro acoplado por Gq a la activación de la fosfolipasa C (P2Y1) y el tercero, es un receptor ionotrópico, P2X1, mediador del influjo rápido de  $\text{Ca}^{2+}$ . El receptor P2Y1 media en el cambio de forma inducido por el ADP (movilización de calcio en el citosol a través de la activación de la fosfolipasa C), mientras que el receptor P2TAC es esencial para la agregación, aunque esta respuesta resulte de la señalización a través de P2TAC y P2Y1<sup>123,124</sup>. El antagonismo de cada uno de estos receptores es suficiente para inhibir la agregación, lo que sugiere que todos los receptores interactúan para obtener una respuesta completa.

### - Ionóforo del calcio

Transporta cationes bivalentes a través de la membrana plaquetaria y desencadena la reacción de agregación por un aumento de calcio citoplasmático.

### - Colágeno

El colágeno es un potente estímulo para la activación plaquetaria, como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, esto ocurre fundamentalmente con los tipos I, III y VI y no con el colágeno monomérico y el tipo IV, que causan nula o mínima activación. Una vez las plaquetas entran en contacto con el colágeno fibrilar o los otros cuatro tipos, y tras un tiempo de retraso de aproximadamente un minuto, se

inicia la agregación plaquetaria. Este retraso refleja el tiempo necesario para iniciar la síntesis de prostaglandinas y secretar ADP durante la reacción de degranulación.

### - **Trombina**

La trombina es un fuerte agonista e importante activador de las plaquetas *in vivo*. Esta serinproteasa interviene en el cambio de forma y la secreción de los gránulos densos, gránulos  $\alpha$  y los lisosomas. También activa la GPIIb/IIIa, lo cual da lugar a la unión del fibrinógeno y vWF. Los cambios producidos por la trombina son mediados principalmente por una familia de receptores acoplados a la proteína G y llamados PAR. Han sido identificados cuatro PAR (PAR1, PAR2, PAR3 Y PAR4), de los cuales el PAR3 no ha sido detectado en plaquetas humanas. La trombina se une a diferentes proteínas plaquetarias pero sólo hidroliza la proteína V (GPV). Como la actividad proteolítica de la trombina es requerida para iniciar la agregación plaquetaria, parece que la GPV está involucrada en el mecanismo de translocación plaquetario. En concentraciones fisiológicas, la trombina reacciona con 1.000 sitios de unión por plaqueta, la mayoría en la GPIb. Los agentes que bloquean la agregación por ADP también previenen la agregación inducida por la trombina, lo que sugiere un mecanismo común a través de los receptores de fibrinógeno.

### - **Adrenalina**

Esta hormona potencia el efecto de otros agonistas plaquetarios<sup>125</sup> y, a concentraciones elevadas, inicia respuestas plaquetarias, incluyendo agregación, producción de tromboxano A2 (TXA2) y secreción. Las plaquetas humanas poseen

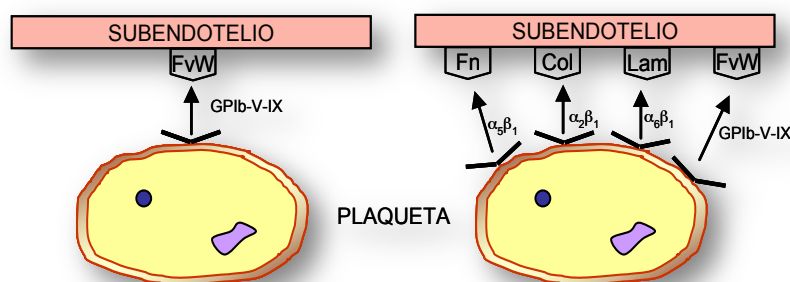
receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  (200-300 lugares de unión por plaqueta)<sup>126</sup>. La adrenalina inicia las funciones plaquetarias por unión a estos receptores adrenérgicos de la superficie, pero las concentraciones de adrenalina requeridas para producir agregación *in vitro* son muy altas, tanto que nunca se alcanzan *in vivo*.

### 1.3.2.2. Fases de la activación plaquetaria

Cuando son expuestas a los agonistas, las plaquetas presentan diferentes respuestas íntimamente relacionadas: la adhesión y cambio de forma, la agregación y la secreción.

#### - Adhesión plaquetaria y cambio de forma

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan preferentemente en la proximidad de la pared vascular<sup>127</sup>. Cuando la continuidad de la capa endotelial se ve interrumpida y queda expuesta la matriz subendotelial, se pierden las propiedades antitrombóticas del endotelio y se produce la adhesión plaquetaria en respuesta al daño de la pared vascular (Fig. 1.10). Las plaquetas ya activadas liberan factores vasoconstrictores y trombogénicos, como el  $\text{TxA}_2$ , la serotonina y el  $\text{ADP}$ <sup>128</sup>.



**Figura 1.10.** Proceso de adhesión plaquetaria al endotelio denudado. El primer contacto entre las plaquetas y el vaso dañado se realiza a través del factor de *von Willebrand* (FvW) y su receptor GPIb-V-IX. La estabilización de la adhesión se consigue a través de los receptores plaquetarios para fibronectina (Fn), colágeno (Col) y laminina (Lam).

El término “adhesión” se refiere a la unión de la plaqueta con cualquier otra célula diferente a otra plaqueta. La adhesión inicial al vaso lesionado es un proceso pasivo que finalmente resulta en la activación plaquetaria. En zonas de la circulación sanguínea donde hay bajo coeficiente de cizallamiento las plaquetas se adhieren al colágeno, la fibronectina y laminina del subendotelio a través de receptores específicos de membrana. En condiciones en las que el coeficiente de cizallamiento es alto, como en gran parte del territorio arterial y en la microcirculación, la interacción de las plaquetas con los componentes del subendotelio anteriormente mencionados requiere un cofactor adicional, que es el vWF. El complejo GP Ib/V/IX es el principal receptor implicado en la adhesión en estas condiciones de flujo y origina señales para la activación de la GP IIb/IIIa<sup>129</sup>.

En el proceso de adhesión intervienen factores de la superficie lesionada, bien frenando directamente las plaquetas circulantes o haciendo que éstas expresen proteínas de frenado en su superficie, que se engloban dentro del grupo de proteínas de adhesión<sup>130</sup>. Entre estas proteínas de frenado cabe destacar las denominadas selectinas, familia de proteínas de la que se han descrito tres miembros (E, L y P). La P-selectina se encuentra en los gránulos alfa plaquetarios y también en los cuerpos de *Weibel-Palade* de las CE. La expresión en la superficie plaquetaria de P-selectina se produce en el curso del proceso de degranulación trombocitaria inducida por múltiples factores, como el colágeno, la adrenalina, el ADP, etc. Estas moléculas

intervienen en la interacción de las plaquetas con los leucocitos, induciendo la activación de éstos y la liberación de mayor cantidad de citoquinas, radicales libres y expresión de TF<sup>131,132</sup>. Todo ello da lugar a la formación y crecimiento del trombo<sup>133</sup>.

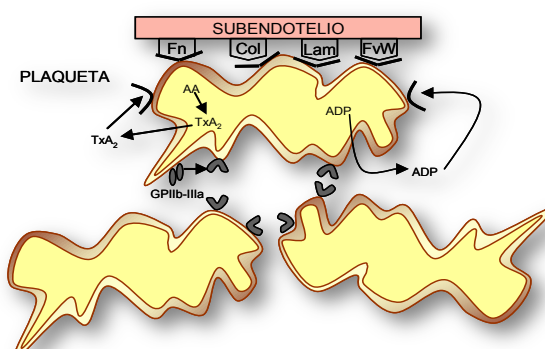
A la adhesión de la plaqueta le siguen diversas modificaciones en su morfología que favorecen la interacción celular: primero pierden la forma discoide inicial con la que circulan por el torrente sanguíneo y adquieren una forma esferoide y, segundo, se produce una expansión de la plaqueta con emisión de pseudópodos como resultado de la reorganización del citoesqueleto de actina. En las plaquetas en reposo el 40-50% de la actina es actina F (filamentosa) y el resto es actina G (monomérica). Tras la activación, la actina F aumenta hasta el 70-80%, con el correspondiente descenso de la actina G. Esta polimerización es controlada por la profilina plaquetaria. Así mismo, a medida que la actina G se transforma en actina F se incorporan troponina y tropomiosina<sup>134</sup>.

### - **Agregación plaquetaria**

La agregación es un proceso energético que consiste en la unión de las plaquetas activadas unas con otras. La activación, que ocurre después del contacto con el subendotelio, con agonistas liberados por otras plaquetas o con trombina inicia la expresión de receptores funcionales de la membrana, los cuales determinan la interacción plaqueta-plaqueta.

Este proceso es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y del fibrinógeno, que hace de puente entre las plaquetas. En la fase inicial de la agregación, la unión del

fibrinógeno a su receptor, el complejo IIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) es reversible, pero enseguida se hace irreversible debido a la estabilización de los puentes de fibrinógeno por diferentes factores (Fig. 1.11). La interacción de las plaquetas, como consecuencia de la agregación, induce una reacción de liberación que facilita el reclutamiento de más plaquetas.

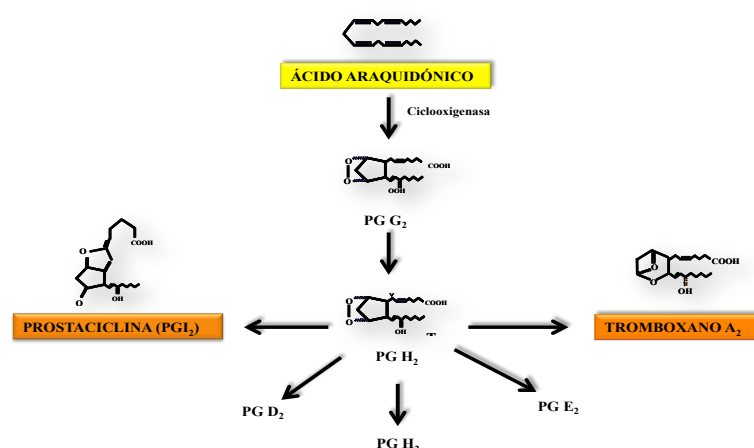


**Figura 1.11.** Agregación plaquetaria. Se forman pseudópodos plaquetarios y se libera el contenido de los gránulos. La liberación de tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) y ADP refuerza la activación plaquetaria. La unión entre plaquetas es mediada por la activación del receptor de fibrinógeno (GPIIb/IIIa). (**FvW**: factor de von Willebrand; **Fn**: fibrinectina; **Col**: colágeno; **Lam**: laminina;  $\alpha_5\beta_1$ : receptor de fibrinectina;  $\alpha_2\beta_1$ : receptor de colágeno;  $\alpha_6\beta_1$ : receptor de laminina; **GPIb/V/IX**: receptor del factor de Von Willebrand; **AA**: ácido araquidónico).

Estos mecanismos de reconocimiento de la lesión son altamente eficaces en condiciones fisiológicas, aunque inespecíficos. De esta manera, en situaciones patológicas, como en la rotura de una placa de ateroma, las plaquetas circulantes se comportan del mismo modo que cualquier lesión en la pared vascular normal, pudiendo condicionar un evento isquémico agudo en el territorio de irrigación del vaso<sup>135</sup>.

La agregación plaquetaria llevada a cabo por los agregantes primarios (ADP, trombina, colágeno...) se considera bifásica, ya que producen una acción inicial

directa sobre la plaqueta y, posteriormente, una agregación secundaria a la liberación de distintas sustancias, como el ADP y el ácido araquidónico (AA). Se inicia así la vía eicosanoide de las plaquetas, con la liberación de AA a partir de fosfolípidos plaquetarios y mediada por fosfolipasas. El araquinodato es metabolizado por una ciclooxigenasa y una lipooxigenasa citoplásmica (Fig. 1.12).



**Figura 1.12.** Metabolismo del ácido araquidónico secretado por las plaquetas para la formación de prostanoideos.

La ciclooxigenación del AA da lugar a compuestos intermedios transitorios, los endoperóxidos PG G<sub>2</sub> y PG H<sub>2</sub>, que son transformados en tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) por la tromboxano sintetasa<sup>136</sup>. El TxA<sub>2</sub> es liberado por las plaquetas activadas, interacciona con receptores específicos de superficie y potencia la agregación plaquetaria mediante la hidrólisis del fosfoinositósido y elevación del calcio citosólico. La movilización de calcio implica una inhibición de la adenilato ciclasa y un descenso de adenosín monofosfato cíclico plaquetario (AMPc). El TxA<sub>2</sub> también posee un potente efecto vasoconstrictor, lo que condiciona modificaciones en el flujo sanguíneo, que a su vez favorecen la adhesión plaquetaria por aumento del rozamiento.



- **Secreción plaquetaria: factores liberados por la plaqueta**

Cuando las plaquetas son activadas se produce la secreción de numerosas sustancias contenidas en los gránulos. El ensamblaje y contracción del sistema actina-miosina es responsable de la centralización y de la secreción activa del contenido granular. Durante el proceso de secreción las membranas de los gránulos se funden con las del sistema canalicular abierto mediante la intervención del  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>118</sup>.

Los gránulos densos secretan, entre otras sustancias, ADP y serotonina, que van a activar a otras plaquetas que se encuentren en proximidad. Los gránulos  $\alpha$  liberan proteínas tales como el vWF, el PF4, la  $\beta$ -tromboglobulina, la fibronectina y el fibrinógeno. Los lisosomas liberan principalmente hidrolasas ácidas.

**1.4. FUNCIÓN DE LAS PLAQUETAS MÁS ALLÁ DE LA HEMOSTASIA: INFLAMACIÓN Y ARTERIOSCLEROSIS.**

Las plaquetas representan un papel fundamental en la hemostasia y prevención del sangrado. Sin embargo, es probable que contribuyan en otros procesos distintos de este, como el desarrollo de respuestas inflamatorias e inmunes, mantenimiento de la integridad vascular y curación de lesiones. Las plaquetas son capaces de reclutar leucocitos y células progenitoras en los sitios de lesión de la pared vascular y trombosis, ya que producen, almacenan y liberan factores proinflamatorios, antiinflamatorios y angiogénicos a la circulación. En modelos experimentales se ha

demostrado que estas funciones contribuyen a la aterogénesis, sepsis, hepatitis, reestenosis y rechazo a trasplantes<sup>137</sup>.

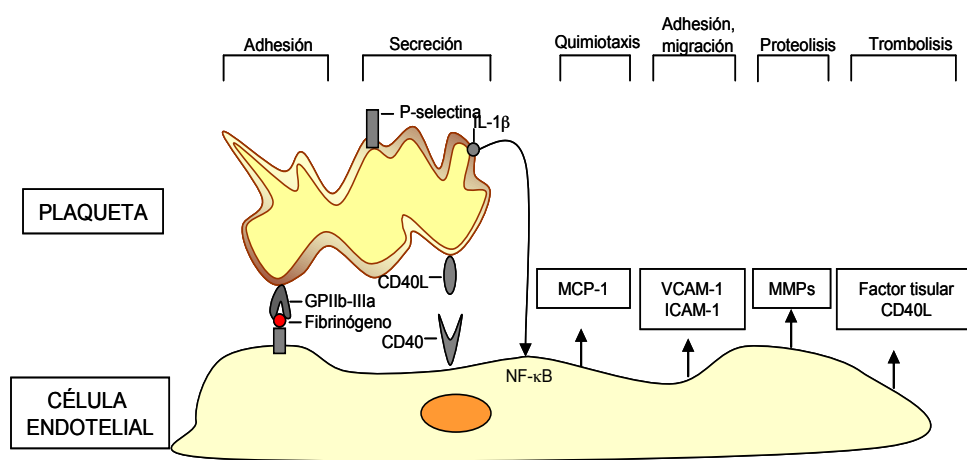
#### **1.4.1. La plaqueta como productora de mediadores bioactivos**

La capacidad de producir, almacenar y liberar mediadores bioactivos permite a las plaquetas ejercer un importante papel en la modulación de otras células, como leucocitos o las CE. Cuando es estimulada por la trombina, la plaqueta secreta más de 300 tipos de proteínas<sup>138</sup>. Y, además de la liberación de sustancias bioactivas, se producen cambios en la composición de la membrana plaquetaria, resultando en la expresión de P-selectina y de GPIIb/IIIa. La expresión de P-selectina es especialmente importante en la interacción de la plaqueta con los leucocitos, aunque también sirve como proteína de unión al complemento (C3b)<sup>139</sup>.

Las plaquetas no son meros almacenes de moléculas bioactivas, sino que también sintetizan mediadores lipídicos como el TxA<sub>2</sub> y participan en el metabolismo transcelular, que resulta en la producción de ambos tipos de moléculas, proinflamatorias y antiinflamatorias. Han demostrado ser *células* más complejas de lo que en un principio se consideró, capaces de sintetizar proteínas mediante mecanismos únicos y extranucleares de traslación del mRNA dependientes de diferentes estímulos o señales<sup>140</sup>. Entre otras proteínas (ya mencionadas previamente), la plaqueta puede sintetizar componentes directamente implicados en los procesos inflamatorios, como es la IL-1 $\beta$ <sup>141</sup>, quimioquinas (RANTES, PF4), la gelatinasa B (MMP-9) o el CD40L<sup>142</sup>.

### 1.4.2. La plaqueta como *célula* inflamatoria

En la última década se han realizado grandes avances en el estudio de la arteriosclerosis como una enfermedad inflamatoria<sup>143</sup>. Poseemos una creciente evidencia de la contribución de las plaquetas en este proceso tras las observaciones publicadas por autores como *Massberg*<sup>144</sup> y otros<sup>145</sup>. Las plaquetas activadas interactúan con diferentes tipos celulares en la pared vascular mediante receptores y mecanismos paracrinos y autocrinos que condicionan un círculo de amplificación de la respuesta inflamatoria<sup>146</sup>. Todos estos procesos forman parte de múltiples enfermedades cardiovasculares y patologías inflamatorias, como el infarto agudo de miocardio o la angina inestable, pero también en la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>147</sup>, la artritis<sup>148</sup> o la sepsis<sup>149,150,151</sup>. Por tanto, la plaqueta puede considerarse una *célula* con una actividad proinflamatoria propia gracias a la síntesis de numerosas proteínas que actúan de manera ordenada sobre diferentes funciones biológicas, como la agregación, la proliferación y supervivencia celular, la quimiotaxis o la proteólisis, cada una de las cuales acelera el proceso inflamatorio y el reclutamiento celular (Fig. 1.13).



**Figura 1.13.** Esquema de la plaqueta como *célula* inflamatoria que interactúa con la célula endotelial.

### 1.4.3. Interacción de la plaqueta con distintos tipos celulares

El conocimiento del papel de las plaquetas en el desarrollo y severidad de diferentes enfermedades, más allá de la clásica hemostasia, continúa emergiendo, particularmente en el área de la inflamación y de la respuesta inmune.

#### 1.4.3.1. Células endoteliales

En condiciones fisiológicas se ha considerado que las plaquetas no se activan ni interactúan con el endotelio intacto, ya que normalmente las CE controlan la reactividad plaquetaria a través de señales inhibitorias. Sin embargo, un endotelio *inflamado* adquiere propiedades que permiten la interacción con la plaqueta. Y, al contrario, estudios *in vitro* han demostrado cómo las plaquetas activadas son capaces de interactuar con el endotelio intacto<sup>152,153</sup>.

Estudios *in vivo* parecen demostrar que las plaquetas podrían intervenir en el desarrollo de la disfunción endotelial. La adhesión de las plaquetas al endotelio acontece incluso cuando existe un alto estrés de cizallamiento, aunque no haya lesión de la pared vascular<sup>154,155,156</sup>. Se ha demostrado que las plaquetas liberan diferentes agonistas, como la serotonina, el ADP y el ATP, que estimulan la producción de NO en el endotelio en los momentos iniciales y de forma transitoria. Sin embargo, en exposiciones prolongadas se produce el efecto contrario: disminuyen la capacidad del endotelio de liberar NO, favoreciendo, por tanto, la disfunción endotelial. Se desconoce actualmente el mecanismo por el que las plaquetas pueden potenciar o reducir la eNOS en la disfunción endotelial, pero entre todas las sustancias que son

capaces de liberar, la IL-1 $\beta$  parece tomar gran importancia. De hecho, esta interleuquina es uno de los mediadores más potentes en la interacción de la plaqueta activada con el endotelio<sup>157</sup>. Adicionalmente, estudios *in vitro* han demostrado que la coincubación de CE con plaquetas activadas con trombina inducen la secreción de IL-6 e IL-8 y de la quimioquina MCP-1 mediada por IL-1 $\beta$  plaquetaria<sup>158</sup>. La IL-1 $\beta$  no sólo es capaz de modificar la liberación de factores quimiotácticos por el endotelio, sino que además puede incrementar la expresión de moléculas de adhesión, como la ICAM-1 y la  $\alpha_v\beta_3$ <sup>159</sup>, promoviendo la adhesión de neutrófilos y monocitos al endotelio.

#### **1.4.3.2. Leucocitos**

El reclutamiento de leucocitos tras el daño endotelial requiere múltiples pasos de adhesión y señalización celular, incluyendo uniones mediadas por selectinas y rodamiento, activación leucocitaria, adhesión firme por integrinas y diapédesis. Todo ello resulta en la infiltración de células inflamatorias en la pared vascular<sup>160</sup>. Las plaquetas activadas promueven el reclutamiento de leucocitos, punto clave en el desarrollo de la arteriosclerosis<sup>161</sup>.

Las plaquetas interactúan físicamente con ambas células, el endotelio y los leucocitos. Esta interacción puede realizarse de dos formas: primero, uniéndose las plaquetas a los leucocitos y mediando en la unión de éstos con la pared vascular por la activación de receptores para la adhesión de leucocitos y, segundo, ejerciendo como puente entre el endotelio y los leucocitos, previa adhesión de las plaquetas a la pared vascular. La familia de las selectinas intervienen en los estadios iniciales de la

interacción<sup>162</sup>, siendo la P-selectina la que representa un papel fundamental en el contacto plaqueta-leucocito. Uno de los principales candidatos del reclutamiento de monocitos es RANTES, ya que se ha demostrado que actúa como iniciador del arresto de los leucocitos en el endotelio<sup>163</sup> mediado por P-selectina<sup>164</sup>.

La liberación de CD40L (CD154) derivado de las plaquetas induce respuestas inflamatorias en el endotelio. El receptor CD40 se expresa en varios grupos celulares, entre ellos plaquetas, células B maduras y algunos linfocitos Tc y Th<sup>165,166,167</sup>. Por ello, la interacción entre CD40 y CD40L está relacionada principalmente con la respuesta inmune mediada por linfocitos B y T, aunque también incluye la interacción plaqueta-endotelio y plaqueta-leucocito. *Henn et al*<sup>83</sup> demostraron que las plaquetas almacenan grandes cantidades de CD40L y las liberan en pocos segundos tras su activación *in vitro*. La unión del CD40L plaquetario con el CD40 de las CE produce un aumento en la liberación endotelial de IL-8 y MCP-1 y la expresión de receptores de adhesión como E-selectina, VCAM e ICAM-1<sup>83</sup>, promoviendo la adhesión de monocitos y linfocitos. La interacción plaqueta-leucocito también promueve el estado inflamatorio: el CD40L expresado por linfocitos T y la captación de CD40L soluble por las plaquetas inducen la activación de la plaqueta aumentando la expresión de P-selectina y la liberación de RANTES plaquetarios<sup>168</sup>. La liberación de RANTES induce además la adhesión de células T al endotelio<sup>168</sup> y el reclutamiento de monocitos mediado por P-selectina<sup>164,169</sup>.

Existen evidencias de que la respuesta inflamatoria mediada por la interacción de CD40-CD40L entre linfocitos y plaquetas puede mediar en el desarrollo de arteriosclerosis y la progresión de la misma, ya que se ha visto una correlación entre

los niveles de CD40L en plaquetas y linfocitos con la aparición de síndrome coronario agudo<sup>170</sup>.

#### 1.4.3.3. *Células progenitoras endoteliales*

Actualmente, uno de los principales aspectos en estudio es la contribución de las células progenitoras endoteliales (EPC) en el desarrollo de la arteriosclerosis. Las EPC de la médula ósea expresan típicamente CD34 y CD13 y tienen la capacidad de diferenciarse en CE y así reparar un daño en la pared vascular<sup>171,172,173</sup>. Existen múltiples estímulos físicos y químicos que potencialmente pueden movilizar EPC de la médula ósea, incluyendo el ejercicio, la edad, el tabaquismo, la diabetes y los síndromes coronarios agudos<sup>174,175</sup>. Como se ha indicado anteriormente, estas EPC pueden contribuir a la reparación vascular diferenciándose en CE, sin embargo, también pueden contribuir a la progresión de la arteriosclerosis debido a que también son capaces de diferenciarse en CML o células espumosas<sup>176,177</sup>.

Cuando se produce una lesión en la pared vascular, la matriz extracelular queda expuesta. Sin embargo, las EPC no son capaces de expresar las moléculas necesarias para la interacción con el colágeno, la fibronectina o la vimentina y, por tanto, no pueden adherirse directamente a la pared vascular. Las plaquetas son capaces de actuar como *células puente* entre las EPC y el endotelio<sup>178</sup>. La adhesión de las EPC CD34+ con las plaquetas ya inmovilizadas en el endotelio puede realizarse por  $\beta 1$  y  $\beta 2$  integrinas de las EPC o P-selectinas de las plaquetas<sup>177,179</sup>. Además, las plaquetas no sólo reclutan a las EPC, sino que apoyan su proceso de diferenciación<sup>180,181</sup>.

#### 1.4.4. La plaqueta en el mantenimiento de la integridad vascular

Las plaquetas también representan un papel crucial en el mantenimiento de la pared vascular. Aproximadamente un 18% de todas las plaquetas está involucrado en el mantenimiento de la integridad vascular<sup>182</sup>. Estudios *in vitro*<sup>183</sup> han demostrado que al almacenar glándulas tiroideas para trasplante mantienen el endotelio íntegro si se perfunden con plasma rico en plaquetas. El papel de las plaquetas en el mantenimiento de la pared vascular puede diferir mucho en condiciones patológicas: la adhesión plaquetaria es necesaria para la estabilización en las zonas de endotelio dañado, pero no en vasos tumorales<sup>184</sup> o en el contexto de un proceso inflamatorio<sup>185</sup>.

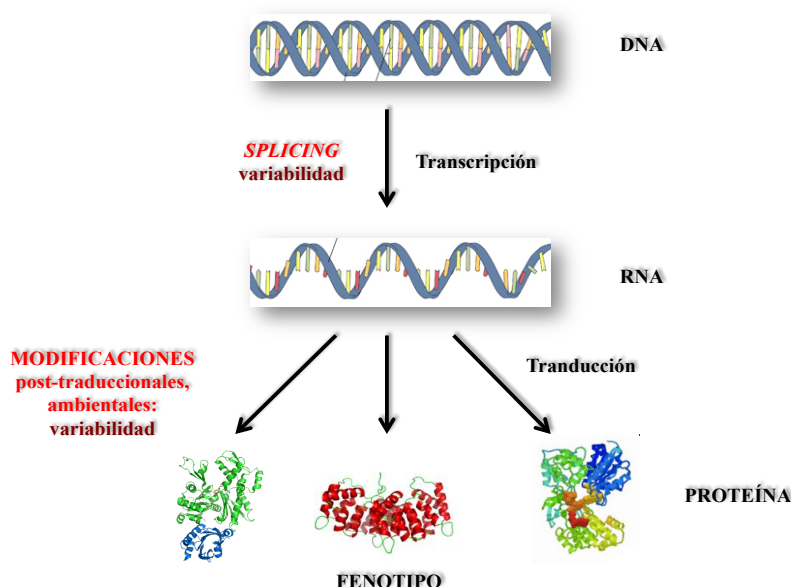
#### 1.5. PROTEÓMICA

La proteómica es una técnica que permite el estudio a gran escala de las proteínas de una muestra, constituyendo uno de los más útiles y potentes métodos de separación de proteínas que existe actualmente. El término proteómica fue introducido por *Marc R. Wilkins* para hacer referencia al conjunto de proteínas identificadas mediante 2-DE en una muestra biológica compleja en un momento determinado<sup>186</sup>. La tecnología utilizada para la separación de las proteínas es relativamente reciente: en la década de los 70 la electroforesis en dos dimensiones se utilizaba como una potente herramienta para la separación y cuantificación de proteínas<sup>187</sup>. Su alta resolución, su sensibilidad y reproducibilidad hicieron a esta técnica cada vez más popular en la década de los 80, principalmente tras la aparición de las membranas PVDF (del inglés *polyvinylidene difluoride*)<sup>188</sup> y la creación de la primera base de datos para geles bidimensionales. Posteriormente, con la aparición y mejora de diversos métodos de



preparación y extracción de proteínas de la muestra, así como de las distintas herramientas de secuenciación (método de secuenciación EDMAN<sup>189</sup>), comenzó a tener una mayor importancia como método de análisis de las proteínas presentes en los distintos tipos de muestras.

El *proteoma* de un organismo es el conjunto de proteínas complementarias del genoma funcional. El proteoma es altamente dinámico, varía acorde al tipo de célula y su estado funcional y puede reflejar cambios inmediatos y característicos en respuesta a determinadas enfermedades o estímulos externos. Este conjunto de proteínas presentes en un fluido corporal, un tejido o un organismo en realidad es un subconjunto de todos los posibles productos del genoma en un momento dado, por lo que el proteoma no puede predecirse directamente a partir de la información estática del genoma. Una proteína puede existir en múltiples formas según modificaciones postraduccionales o procesos de degradación que modifican la estructura de la misma, su localización, función y recambio (Fig. 1.14).



**Figura 1.14.** Esquema en el que se muestran los diferentes pasos en la expresión de proteínas y su variabilidad.

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Se considera que en el ser humano hay entre seis y siete veces más proteínas que genes (entre 200.000 y 250.000 proteínas). Las proteínas, a diferencia de los genes, tienen una complejidad y variabilidad mayores. Dado que poseen una función estructural, enzimática, inmunológica, contráctil, homeostática, transductora de señales, etc, son indispensables para todas las funciones biológicas. Por ello, la investigación centrada en estos productos derivados del genoma, modificables en condiciones de enfermedad, es fundamental y probablemente nos permitirá entender la fisiopatología de enfermedades tan prevalentes como la arteriosclerosis.

En el momento actual nos encontramos en la *era postgenómica*, en la que la proteómica va a contribuir al entendimiento de la función de los genes<sup>190</sup>. Precisamente porque frecuentemente es difícil predecir la función de una proteína basándose en la homología con otras proteínas, e incluso su estructura tridimensional, la determinación de los componentes de un complejo proteico o de una estructura celular es primordial en el análisis funcional. En este sentido, la proteómica es la tecnología más prometedora para avanzar en este área de interés. La integración genómica-proteómica permitirá comprender los mecanismos implicados en la aparición y desarrollo de una enfermedad.

Se estima que el genoma humano contiene entre 20.000 y 25.000 genes codificantes de proteínas, número muy inferior a las estimaciones iniciales. Sin embargo, las células humanas recurren ampliamente al *splicing* y a las modificaciones

postraduccionales para producir varias proteínas distintas a partir de un único gen<sup>191,192</sup>. De forma práctica, el genoma *tan solo* porta la información necesaria para una expresión perfectamente coordinada y regulada del conjunto de proteínas que conforman el proteoma. Mientras que el genoma es relativamente constante (incluso podría considerarse un componente estático de la célula), el proteoma está continuamente cambiando, muchas veces simplemente por la interacción del genoma con el entorno. Todas estas modificaciones y otros cambios secundarios a estímulos ambientales (enfermedades, fármacos...) condicionan el desarrollo de diferentes mapas de expresión proteica, o lo que es lo mismo, diferentes fenotipos (Fig. 1.14), que, a su vez, proporcionan una gran diversidad y diferente susceptibilidad a determinadas enfermedades.

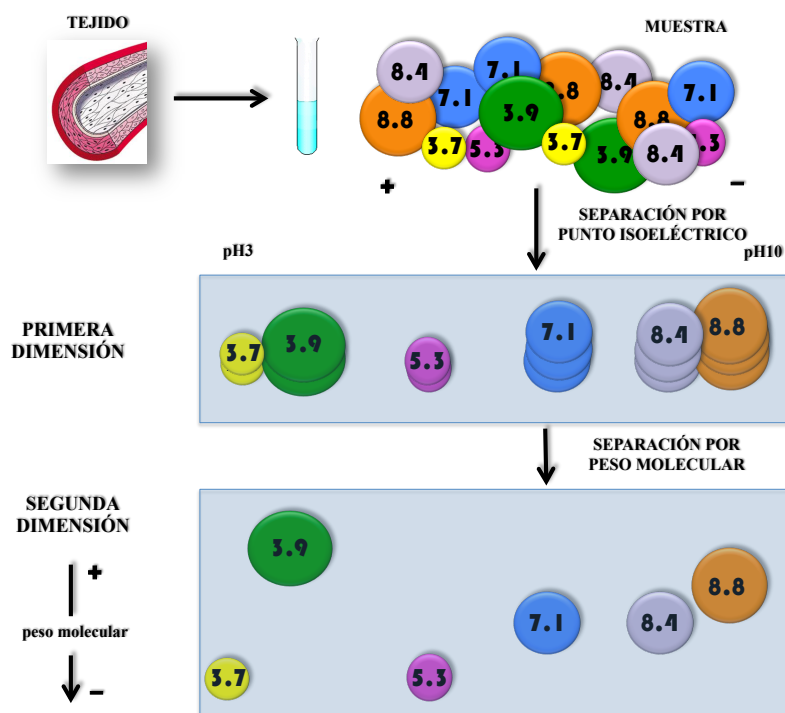
La proteómica utiliza la combinación de diferentes técnicas sofisticadas, incluyendo la 2-DE en gel de poliacrilamida, análisis de imagen, espectrometría de masas, secuenciación de aminoácidos y bioinformática para separar, identificar y caracterizar las proteínas<sup>193</sup>. Con todo ello, la proteómica permite la obtención de una información cualitativa y cuantitativa: es posible determinar la existencia o no de una proteína y, además, cambios cuantitativos en su expresión comparando los resultados en la muestra basal y tras un estímulo o condición patológica, por ejemplo. Otra ventaja de esta técnica es la capacidad de detectar las distintas isoformas de una misma proteína (derivadas de las distintas modificaciones bioquímicas postraduccionales), circunstancia que no es posible utilizando el resto de técnicas de análisis e identificación de proteínas. Este punto es de gran importancia, ya que es posible que las isoformas de una determinada proteína tengan propiedades funcionales distintas a las de la proteína original.

La proteómica, sin embargo, va más allá de la mera catalogación de proteínas, pretendiendo establecer, en último término, su estructura, actividad biológica, modo de acción, localización celular, modificaciones postraduccionales e interacción con otras proteínas o moléculas. De esta manera, la comprensión de las situaciones fisiológicas nos permiten acercarnos al conocimiento de las condiciones patológicas. Desde un punto de vista práctico son muchas las aplicaciones que se pueden vislumbrar en diversos terrenos científicos y biotecnológicos, pero la aplicación más llamativa (y con más impacto comercial) es el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico molecular y la medicina personalizada. De hecho, este aspecto de la proteómica está haciendo que la industria farmacéutica invierta grandes cantidades en el desarrollo de esta metodología y se esté avanzando rápidamente. Finalmente, se buscará construir un completo mapa tridimensional celular, con la localización de cada proteína y los procesos o cambios a los que pueden verse sometidas, ayudándonos todo ello a la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en cualquier proceso metabólico o patológico.

### 1.5.1. Fundamentos de la técnica

La electroforesis bidimensional (2-DE, del inglés *2-dimensional electrophoresis*) es la base fundamental para desarrollar los mapas de expresión proteica. A pesar de que el nombre sugiere que se trata de un proceso de dos pasos, en realidad es algo más complejo e, incluso, pueden considerarse hasta cinco pasos: 1, la preparación de la muestra para la primera separación; 2, la primera separación de la muestra; 3, la interfase entre la primera y segunda separación; 4, la segunda separación; 5, la

detección de proteínas. Esta técnica nos permite separar las proteínas de cualquier muestra en dos dimensiones, el peso molecular (tamaño) y el punto isoeléctrico (pH en el cual la carga neta de la proteína es cero), lo que dará lugar a un mapa de expresión proteica en el que cada proteína (y sus isoformas) estarán distribuidas en la coordenada formada por las dos variables de separación. En principio, esta coordenada será única para cada proteína, por lo que puede considerarse como el documento de identidad de la misma<sup>194</sup>. El concepto básico de la técnica se esquematiza en la Figura 1.15.



**Figura 1.15.** Esquema del principio de la electroforesis bidimensional. El proceso comienza con la extracción de las proteínas desde la muestra biológica. Dicha muestra es separada en dos dimensiones, primero por punto isoeléctrico y segundo por peso molecular.

Generalmente, el orden de separación es primero por el punto isoeléctrico y posteriormente por el peso molecular. Sin embargo, este esquema de actuación no es obligatorio, y se han publicado trabajos con el orden inverso<sup>195,196</sup>. Realmente, el

orden clásico es el que casi exclusivamente se realiza, tanto por motivos económicos (la segunda y mayor separación es mejor que sea la más barata, como lo es la electroforesis SDS) y por razones técnicas, ya que los geles SDS de electroforesis son mucho más fáciles de teñir que los isoelectricos y de manejar en las técnicas de análisis<sup>197</sup>.

Esta técnica posibilita la identificación de proteínas que hayan sufrido algún tipo de modificación postraducciona, ya que cuando una proteína sufre una modificación postraducciona (fosforilación, glicosilación, etc.) ésta suele conferirle un cambio tanto de carga como de peso molecular. Los cambios que ocurren tras la traducción son, por tanto, reflejados en el mapa proteico, apareciendo la proteína en una localización distinta a la normal.

### **1.5.1.1. Preparación de las muestras**

La situación ideal consiste en solubilizar todas las proteínas de la muestra, sin ninguna modificación añadida durante todo el proceso y eliminando otros componentes biológicos que puedan interferir en la separación de las proteínas. La carga de proteínas que contiene la muestra no debe alterarse en ningún momento, por lo que se deben utilizar sustancias químicas no cargadas que desnaturalicen las proteínas y las mantengan en solución<sup>198</sup>. Por razones prácticas, como constituye una mínima interferencia con los geles que contienen el SDS unido a las proteínas y una mínima interferencia con los métodos de ensayo, el detergente CHAPS es de los más utilizados<sup>199</sup>.

Otro punto de gran importancia es que para conseguir el punto isoeléctrico se requieren campos eléctricos de gran fuerza. Dado que la carga de las proteínas constantemente va disminuyendo hasta alcanzar el punto isoeléctrico, se requieren estos campos potentes para que en los últimos milímetros las proteínas migren a una velocidad decente. De hecho, es muy común utilizar hasta 170 V/cm en el punto isoeléctrico, números mucho mayores que los empleados en la electroforesis SDS (15 V/cm). En contrapartida, la utilización de estos campos de gran fuerza obliga a trabajar con muy bajas fuerzas iónicas, por el calentamiento.

#### **1.5.1.2. Primera dimensión**

En comparación con la fase de preparación de las muestras, la separación por punto isoeléctrico en la primera dimensión generalmente es más sencilla. Para esta fase se utilizan tiras de gel de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado (IPG, del inglés *Isoelectric Phocusing Gradient*). La introducción de los IPG por Bjellqvist *et al*<sup>200</sup> tuvo un impacto significativo en la primera dimensión de la electroforesis para separar mezclas complejas en un amplio rango de pH. Estos geles permiten una formación estable y reproducible de gradientes de pH capaz de focalizar proteínas ácidas y básicas en un único gel<sup>201</sup>.

En la primera dimensión se aplica una corriente eléctrica que consigue que las proteínas presentes en el extracto migren a lo largo de la tira IPG y se distribuyan por toda su longitud hasta alcanzar su punto isoeléctrico, es decir, el punto donde su carga neta sea cero, y en ese momento se detienen. Así pues, en la primera dimensión las proteínas se separan según carga (Fig. 1.15).

### 1.5.1.3. Segunda dimensión

La segunda dimensión se realiza sobre geles SDS-PAGE (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) para la separación de las proteínas en función de su peso molecular (Fig. 1.15). El SDS es un detergente aniónico utilizado para alinear las proteínas y aplicar una carga negativa a cada proteína proporcional a su masa. La realización de esta segunda dimensión aporta la identificación de nuevas proteínas y, además, la medición de la abundancia relativa comparando entre diferentes muestras.

### 1.5.1.4. Detección de las proteínas

Una vez realizada la segunda dimensión, las proteínas presentes en el gel deben visualizarse para poder cuantificarlas y analizarlas. Existen distintos tipos de tinción del gel que, fundamentalmente, se diferencian según la sensibilidad para la detección de proteínas. Destacan la tinción con azul *Coomassie*, la tinción radiactiva, la fluorescente y, por último, la tinción con nitrato de plata. Los métodos más empleados son la tinción con plata y con el azul de *Coomassie*<sup>202</sup>, en especial la primera por su sensibilidad<sup>203,204</sup>, su durabilidad en el tiempo y la buena calidad de imagen que ofrece. Además, este tipo de tinción es compatible con el análisis por espectrometría de masas. Sin embargo, el método más recomendado de tinción para realizar la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas es el azul de *Coomassie*, ya que, a pesar de su moderada sensibilidad, tiene buena homogeneidad y la compatibilidad con la espectrometría es excelente<sup>205</sup>.



### 1.5.2. Análisis de la imagen

Una vez obtenido el gel bidimensional o mapa de expresión proteica hay que analizar la imagen. Actualmente poseemos programas informáticos (PD-QUEST, MELANIE, etc.) que facilitan mucho el estudio de este tipo de imágenes. De hecho, este *software* realiza un análisis completo de los mapas de expresión proteica y permite una posterior comparación entre diferentes mapas. Adicionalmente, existe la posibilidad de realizar comparaciones visuales con mapas proteómicos integrados en bases de datos disponibles en internet. En este sentido, la base de datos suiza *Swiss-Prot* (<http://www.expasy.ch>) es una de las más conocidas y empleadas (Fig. 1.16).

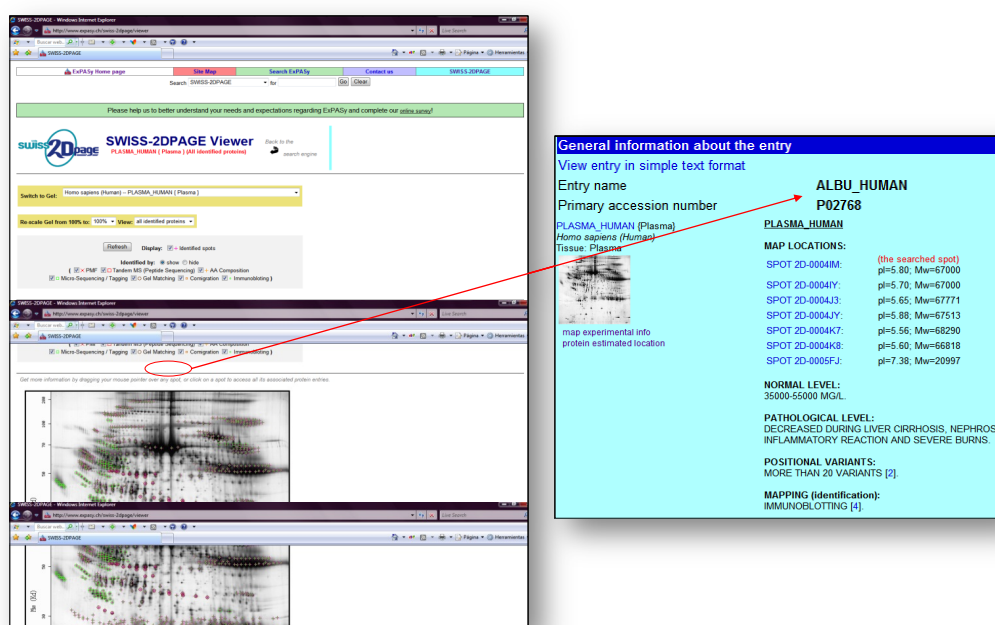


Figura 1.16. Ejemplo de ventanas utilizando la base de datos *Swiss-Prot*.

Para el análisis cuantitativo de las diferentes proteínas del mapa proteómico disponemos de otras herramientas informáticas que facilitan la detección de variaciones en la expresión de las proteínas, siendo de especial utilidad en estudios patológicos. Un ejemplo es el programa denominado *QUANTITY-ONE* (Bio-Rad Laboratories).

### 1.5.3. Espectrometría de masas

La aplicación de la espectrometría de masas (MS) para el análisis cuantitativo y cualitativo del proteoma derivado de muestras complejas ha tenido un gran impacto en la comprensión de la función celular<sup>206</sup>. Hoy en día se estima que mediante esta técnica se pueden detectar proteínas en geles bidimensionales en el rango femtomolar ( $10^{-15}$  M/L). La MS es muy sensible, tolera el análisis de mezclas proteicas y permite la realización de múltiples análisis, por lo que poco a poco ha reemplazado a la secuenciación por el método de EDMAN.

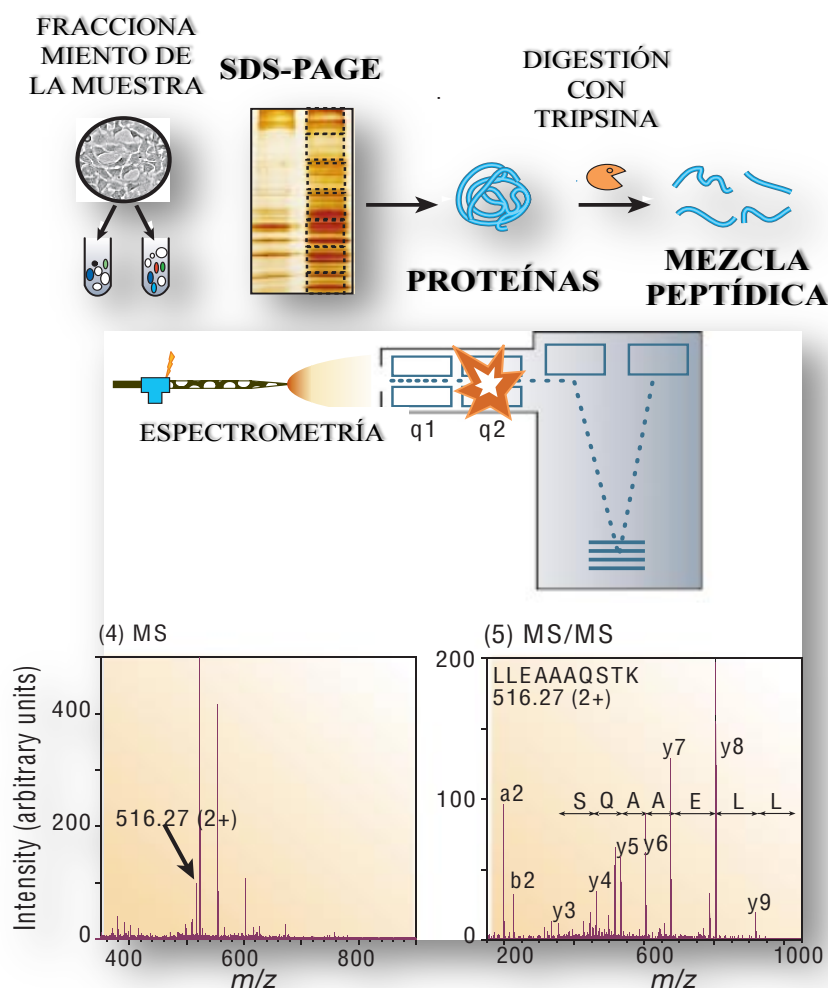
La MS proporciona información sobre la estructura de la proteína: la masa peptídica y la secuencia de aminoácidos. Posteriormente, se utilizarán estos datos para identificarlas con las bases de datos. De esta manera, se determina el tipo y la localización de una modificación postransduccional, por ejemplo.

Las mediciones en la EM se llevan a cabo en fase gaseosa, con los *analitos* ionizados. Por definición, un espectrómetro de masas consiste en una fuente ionizante, un analizador de masa, que mide la ratio masa/carga ( $m/z$ ) de los analitos, y un detector que registra el número de iones en cada valor de  $m/z$ . Las dos técnicas

más utilizadas son las llamadas ESI (del inglés, *ElectroSpray Ionization*) y MALDI (del inglés, *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)<sup>207,208</sup>. El analizador de masa es la tecnología fundamental del instrumento y en el terreno de la proteómica sus claves son la sensibilidad, la resolución, la precisión en la medida de la masa y la capacidad de generar espectros a partir de fragmentos peptídicos (en tándem o espectros MS/MS)<sup>209,210</sup>. Hay cuatro tipos básicos de analizadores de masa utilizados actualmente en proteómica: la trampa de iones (*ion trap*), el tiempo de vuelo o TOF (del inglés, *time of flight*), el cuádruplo y el FT-MS (del inglés, *Fourier Transform ion cyclotron*). Cada uno de ellos es diferente, variando en relación a su fuerza. Por lo general, MALDI se utiliza conjuntamente con analizadores TOF (MALDI-TOF) por su simplicidad, la precisión en la medición de la masa y su sensibilidad. Con este último método se obtiene la llamada *huella peptídica* como resultado del emparejamiento de la lista de masas experimentales con la lista de masas calculadas de todos los péptidos de una base de datos.

El proceso habitual consta de cuatro pasos. El primer paso consiste en el aislamiento de las proteínas de la muestra. La MS es menos sensible en el análisis de toda la proteína que en el estudio de los péptidos y, además, la masa de una proteína intacta por sí sola no es suficiente para su identificación. Por ello, las proteínas son degradadas en el segundo paso, generalmente con tripsina, que rompe dichas proteínas en la zona carboxílica de los residuos de lisina y arginina (a no ser que estén seguidos por una prolina), formando huellas peptídicas de péptidos predecibles. En el tercer paso los péptidos son ionizados tras el tratamiento con el láser, que les confiere una carga, y son separados según la ratio  $m/z$ . En el cuarto paso se obtiene el espectro de masas de péptidos y el ordenador genera una lista priorizada de estos péptidos por

fragmentación y una serie de experimentos en tándem posteriores, que consisten en el aislamiento de un péptido dado, fragmentación por colisión con gas y recopilación de un espectro tándem o MS/MS (Fig. 1.17).



**Figura 1.17.** Esquema de un experimento genérico de proteómica basado en la espectrometría de masas. Fuente: internet, modificada por el autor.

#### 1.5.4. Futuro de la proteómica

Después de más de tres décadas de investigación en este campo, la 2-DE es ya una técnica madura, que ofrece gran flexibilidad y resolución modulable<sup>211</sup>. Por tanto, no son esperables grandes avances en la pura realización de la electroforesis. Sin

embargo, en un futuro sí podrán objetivarse importantes consecuencias en el diagnóstico clínico y tratamientos derivados de la proteómica.

El objetivo último de la medicina moderna es poder ofrecer una medicina personalizada a cada paciente. Actualmente, el centro de muchas investigaciones va dirigido a conocer la etiología de la enfermedad en cada paciente, la respuesta concreta de cada paciente a un determinado factor de riesgo, los factores que facilitan la progresión de la enfermedad, los factores genéticos que hacen a ese paciente susceptible a una enfermedad, su perfil metabólico y, concretamente, cuáles son las proteínas que expresa, para poder así identificar el pronóstico del paciente y su susceptibilidad al tratamiento. Estos objetivos requieren de la utilización de *nuevas* tecnologías, entre las que se encuentra la proteómica, ya que estudia la base biológica racional, los productos de la interrelación entre unos determinados factores de riesgo y la expresión génica: las proteínas.

### **1.5.5. La era proteómica en la investigación vascular**

Las enfermedades cardiovasculares son la causa más importante de mortalidad en el mundo occidental y, además, se está produciendo un incremento progresivo también en las sociedades menos desarrolladas. La carga económica de estas enfermedades, incluyendo los gastos en cuidado de la salud y las pérdidas en productividad, se ha calculado en 45.6 billones de euros anuales en la Unión Europea<sup>212</sup> y de 142.5 billones de dólares en Estados Unidos<sup>213</sup>.

La proteómica aplicada a las células vasculares o a las placas arterioscleróticas, cuya expresión proteica se modifica a lo largo de la evolución de la enfermedad, constituyen hoy en día una diana en la investigación en el área cardiovascular, siendo en este terreno una técnica de aplicación relativamente reciente. La mayoría de los estudios proteómicos realizados inicialmente en las enfermedades cardiovasculares consistieron fundamentalmente en modelos descriptivos y han permitido la creación de las bases de datos de las que disponemos. *Brunnel et al*<sup>214</sup> publicaron el mapa de expresión proteica de CE de vena umbilical humana, en el que identificaron 53 proteínas relacionadas con el citoesqueleto, coagulación, apoptosis, presentación de antígenos y funciones enzimáticas. Del mismo modo, en 2001, *McGregor et al*<sup>215</sup> describieron el proteoma de las CML de la vena safena humana sana, identificando 130 proteínas. Más recientemente, se publicó también el proteoma de 83 proteínas de las CML de la arteria mamaria interna<sup>216</sup>. Progresivamente, la proteómica vascular ha ido evolucionando para intentar proporcionar dos tipos de datos: la determinación de proteínas que participan activamente en la fisiopatología de la arteriosclerosis y la búsqueda de nuevas proteínas que potencialmente sirvan como biomarcadores de enfermedad<sup>217</sup>. De hecho, la tendencia es utilizar la proteómica para la comparación de los niveles de expresión de una determinada proteína en diferentes condiciones experimentales. Hace más de 20 años *Stastny et al*<sup>218</sup> compararon extractos de estría grasa con segmentos de íntima sana de aorta humana. Esta comparación se realizó de forma visual, ya que en esa época todavía no había programas informáticos para el análisis de los geles, por lo que solo se identificaron los cambios más evidentes.

En la arteriosclerosis se considera fundamental la disfunción endotelial y la proliferación y migración de las CML. Por otro lado, todo ello ocurre en un marco inflamatorio, en el que factores de crecimiento y citoquinas están involucrados en los cambios de expresión de determinadas proteínas específicas. Este es el caso del TNF- $\alpha$ , citoquina implicada en diferentes procesos críticos de la iniciación y la progresión de la lesión vascular. La utilización de este mediador inflamatorio en cultivos de arterias sanas puede inducir cambios inflamatorios en la pared vascular, modificando por tanto la expresión proteica. Un estudio reciente<sup>219</sup> demostró, utilizando la 2D-E y MS, que la incubación de CML con TNF- $\alpha$  conducía a la infraexpresión o sobreexpresión de determinadas proteínas. *Zamorano-León et al*<sup>220</sup> observaron en segmentos preincubados con TNF- $\alpha$  una mayor expresión de moléculas proinflamatorias (CD40L, PECAM) en el endotelio y una sobreexpresión de la eNOS concentración dependiente.

Otros autores han centrado sus investigaciones en los mecanismos de señalización celular. *Molero et al*<sup>221</sup> demostraron modificaciones en la expresión proteica en células de músculo liso vascular inducidas por el 17 $\beta$ -estradiol, confirmando que los estrógenos pueden modular un amplio rango de vías de señalización en este tipo de células. *Soskic et al*<sup>222</sup> estudiaron los cambios en la vía de señalización de fibroblastos de ratón en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas.

La información que puede aportar la proteómica en la búsqueda de nuevos biomarcadores en las enfermedades cardiovasculares, sumada al análisis del fenotipo clínico, cambios metabólicos y al haplotipo genético, puede informar del perfil de

riesgo cardiovascular para cada paciente<sup>223,224</sup>. Sin embargo, actualmente a nivel cardiovascular la identificación de las modificaciones postraduccionales es prácticamente nula y menos aún se sabe sobre modificaciones en el nivel de expresión de diferentes isoformas de proteínas.

Probablemente, con la introducción de la proteómica, en pocos años el conocimiento de las enfermedades cardiovasculares aumente de forma considerable. En resumen, la proteómica tiene el potencial de revolucionar el modo de diagnosticar, determinar el riesgo y el pronóstico clínico así como las estrategias terapéuticas en individuos con enfermedades cardiovasculares. Incluso ya se ha creado el término *farmacoproteómica*, que consiste en el estudio de la respuesta farmacológica de un paciente en función de las proteínas que expresa. Sin embargo, todavía no hay muchos estudios que analicen los efectos de los fármacos en el proteoma<sup>225,226,227</sup>.

## **1.6. INTERACCIÓN PLAQUETA-ENDOTELIO. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

Hasta no hace mucho tiempo, el concepto de las plaquetas dentro de la arteriosclerosis era el de una célula involucrada en la iniciación de la cascada de la coagulación y como participante de los estadios finales en la evolución de la placa de ateroma, es decir, en la rotura de la placa precedente a la oclusión aguda de la arteria por material trombótico<sup>228</sup>. *Theilmeier et al*<sup>229</sup> demostraron cómo en conejos hipercolesterolémicos la plaquetas se reclutan en sitios propensos a la lesión arteriosclerótica antes de que ésta aparezca y pueden agravar o perpetuar el daño endotelial. Además, estos investigadores observaron que las plaquetas adheridas al endotelio disfuncionante



proporcionanban un punto para el reclutamiento de monocitos en el espacio subendotelial, considerando siempre que esta fuerte interacción con el endotelio es mediada por el vWF, la GPIIb y la P-selectina. Sin embargo, los nuevos avances que se han ido realizando progresivamente en el estudio de los procesos de arteriosclerosis y aterotrombosis han cambiado este dogma. En diferentes estudios se ha comprobado la existencia de plaquetas en todos los estadios de formación de la placa de ateroma, por lo que cada vez ha tomado más relevancia el papel de las mismas en los primeros estadios y no sólo después de la rotura de la placa<sup>230,231</sup>.

El endotelio constituye una barrera activa entre el torrente sanguíneo y los tejidos subyacentes, conteniendo los componentes de la sangre en el espacio intravascular. La integridad de esta monocapa constituye un requisito para el control de la permeabilidad vascular. Como ya ha sido ampliamente demostrado, la actividad plaquetaria está modulada por múltiples factores expresados y liberados por la pared vascular<sup>153,232</sup>. Esta barrera antiadhesiva y antitrombótica que constituye el endotelio sano inhibe la actividad plaquetaria<sup>233</sup>. Existe un equilibrio dinámico entre estos dos estados, modulado a nivel de transcripción genética y a nivel de integridad celular<sup>234</sup>. Sin embargo, bajo un estado inflamatorio, como ocurre en los eventos isquémicos arteriales, las condiciones antitrombóticas de la pared vascular se pierden, promoviendo un estado protrombótico que favorece la activación plaquetaria<sup>235,236</sup>. Diferentes estudios sugieren a las plaquetas como contribuyentes importantes en el proceso inflamatorio que promueve la formación de placas de ateroma. De hecho, las plaquetas se pueden adherir al endotelio intacto en ausencia de una disrupción del mismo.

Actualmente poseemos un amplio conocimiento de los efectos que ejerce la pared vascular sobre las plaquetas<sup>236</sup>, pero son muy escasos y limitados los estudios que examinan el efecto contrario, el de las plaquetas sobre la expresión proteica de la pared vascular. Las plaquetas son fuente de numerosos mediadores, incluyendo factores de crecimiento y otras sustancias que pueden influir en la expresión de proteínas de la pared vascular. *Massberg et al*<sup>237</sup> demostraron que la incubación de monocapas de CML con plaquetas activadas producía un aumento significativo de la secreción de MCP-1 y promovía la migración de CML. Las plaquetas también han mostrado la capacidad de activar factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B, que participa en el desarrollo de la arteriosclerosis. *Gawaz et al*<sup>238</sup> encontraron que las plaquetas activadas con ADP inducían la secreción de MCP-1 y la expresión en la superficie de las CE por un mecanismo mediado por NF- $\kappa$ B. Adicionalmente, encontraron un incremento de la secreción de MCP-1 en presencia de plaquetas no estimuladas, aunque significativamente menor. En este sentido, existen estudios *in vitro* que sugieren que las plaquetas pueden inducir un proceso inflamatorio en cultivos de CE<sup>236</sup>. Del mismo modo, existen estudios *in vivo* que demuestran cómo las plaquetas, bajo condiciones inflamatorias, pueden modular la expresión de proteínas asociadas al proceso inflamatorio. *González-Fernández et al*<sup>239</sup> demostraron una marcada disminución de la sintasa inducible de NO (iNOs) por las plaquetas tras la denudación del endotelio de arteria carótida de ratas, efecto que podía ser bloqueado por los inhibidores de la GPIIb/IIIa .

Las alteraciones en la función de la pared vascular son el origen de muchas enfermedades cardiovasculares, como la arteriosclerosis. Además del control del proceso inflamatorio, hay una amplia evidencia de que el mantenimiento de dicha

función vascular está particularmente relacionado con el metabolismo energético<sup>240</sup>. En concreto, se ha demostrado una dependencia específica del metabolismo de la glucosa<sup>241</sup>. Ya en 1996, *Zhang y Paul*<sup>242</sup> investigaron la importancia de la glucosa, sustrato primario de la glucólisis, en el mantenimiento de la tensión y del proceso de excitación/contracción en arterias carótidas porcinas. Otro punto importante es que durante el proceso de producción energética, en condiciones fisiológicas de aerobiosis, las células de la pared vascular forman ROS, por lo que es de suma importancia un potente sistema antioxidante.

El citoesqueleto y el sistema contráctil son otros componentes críticos de la pared vascular, ya que contribuyen directamente en la modulación de la hemodinámica arterial y mantenimiento de la integridad vascular<sup>243</sup>. La estructura del vaso sanguíneo, incluyendo el citoesqueleto, parece estar regulada por factores mecánicos<sup>244</sup>, aunque otros factores y células circundantes como las plaquetas pueden estar también involucrados en esta regulación. Así, la interacción entre las células de la pared vascular y las plaquetas puede ser más compleja de lo que inicialmente habríamos pensado. Todo ello apunta a la necesidad de más estudios e investigaciones relacionados con este tema.

Hasta ahora había una gran dificultad para la monitorización de los cambios en la expresión proteica al mismo tiempo en una única muestra. Por ello, la nueva tecnología basada en la proteómica, basada a su vez en la 2-DE y la MS, ha emergido con gran fuerza para la cuantificación e identificación de cambios en la expresión proteica de múltiples proteínas e isoformas proteicas en una misma muestra.

**1.7. CONSIDERACIONES GENERALES**

Como se ha detallado anteriormente, más allá del papel en la hemostasia, las plaquetas son capaces de regular una gran variedad de respuestas inflamatorias y han demostrado ser unas *células* clave en la arteriosclerosis. Debido a que la arteriosclerosis es una causa mayor de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados, el entendimiento del papel real de las plaquetas en la inflamación de la pared vascular y la aterogénesis es un tema en auge. Se han alcanzado grandes avances en cuanto al conocimiento del papel de la pared vascular y, más específicamente, del endotelio sobre la regulación de la actividad plaquetaria. Sin embargo, solamente existen datos puntuales sobre qué proteínas son modificadas en su expresión en la pared vascular por la presencia de las plaquetas. En este sentido, aún es necesario penetrar más profundamente en los mecanismos moleculares modificados en la interacción plaqueta-pared vascular para poder desarrollar estrategias terapéuticas. La proteómica se ha ido introduciendo como una herramienta cardinal de investigación y nos puede ayudar a aclarar el papel de las plaquetas en la arteriosclerosis.



---

*"Las ciencias tienen las raíces amargas,  
pero muy dulces los frutos"*

*Aristóteles*

## HIPÓTESIS



*Como se ha detallado en la introducción de la tesis, es bien conocido que el endotelio en condiciones fisiológicas es un inhibidor de la activación plaquetaria. Sin embargo, en condiciones patológicas, en las que existe un alto componente inflamatorio, la célula endotelial pierde su capacidad inhibitoria sobre la plaqueta y se convierte en una célula que estimula la actividad plaquetaria. Pero, mientras que la relación endotelio-plaqueta está muy analizada, poco se conoce sobre la relación o influencia que pueden tener a su vez las plaquetas sobre el endotelio intacto en condiciones fisiológicas o en condiciones en las que exista un componente inflamatorio similar al que ocurre durante la enfermedad vascular. En este sentido, hay que recordar que las plaquetas tienen la capacidad de producir, almacenar y liberar mediadores vasoactivos que podrían contribuir al desarrollo de la disfuncionalidad de la pared vascular afectando a sistemas como el metabolismo energético o el citoesqueleto. Por tanto, las plaquetas podrían estar directamente involucradas en mecanismos de disfunción vascular que se producen durante el desarrollo de la placa de ateroma y, así, podrían inducir cambios en la expresión proteica de las células endoteliales en función del estado inflamatorio de la pared vascular.*





---

*"Quizá la existencia de una respuesta dependa solamente  
de que se haga la pregunta adecuada"*

Richard Whately

## OBJETIVOS



Los principales objetivos de la presente tesis son:

1. Evaluar si las plaquetas son capaces de modificar la expresión proteica de la pared vascular normal, particularmente de aquellas proteínas relacionadas con el citoesqueleto y el sistema contráctil.
2. Determinar si las plaquetas son capaces de modificar la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético de la pared vascular sana.
3. Evaluar si en condiciones en las que la pared vascular se encuentra en un ambiente inflamatorio las plaquetas son capaces de modificar la expresión proteica de las proteínas relacionadas con el sistema contráctil y el citoesqueleto.
4. Evaluar si en condiciones en las que la pared vascular se encuentra en un ambiente inflamatorio las plaquetas son capaces de modificar la expresión proteica de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético.



---

*“No existe una cantidad suficiente de experimentos  
que muestren que estoy en lo correcto;  
pero un simple experimento puede probar que me equívoco”*

*Albert Einstein*

## MATERIAL Y MÉTODO



## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

En la presente tesis se realizaron experimentos *in vitro* para estudiar el efecto de las plaquetas sobre la pared vascular observando los cambios en la expresión proteica en segmentos de aorta bovina incubados con plasma rico en plaquetas en dos concentraciones diferentes: una semejante a la fisiológica ( $10^5$  plaquetas/pocillo) y otra concentración más elevada semejante a la encontrada cuando las plaquetas se activan y forman el trombo ( $10^7$  plaquetas/pocillo). Además, para intentar simular un estado inflamatorio (como ocurre en la arteriosclerosis), se realizaron estas mismas determinaciones en segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$  y posteriormente incubados con plasma rico en plaquetas.

### **4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES**

Se seleccionaron voluntarios sanos con una edad de  $35 \pm 8$  años para obtener plasma rico en plaquetas (PRP). Se consideró como criterio de exclusión la toma de aspirina u otros antiagregantes plaquetarios o antiinflamatorios en los 15 días anteriores a la obtención de la muestra de sangre.

Los voluntarios fueron informados del estudio y firmaron su consentimiento.



## **4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

### **4.2.1. Sangre periférica humana**

La extracción de sangre se realizó por venopunción en antebrazo de una cantidad de 10 ml. La muestra se depositó en tubos estériles con el anticoagulante citrato-dextrosa (10% ACD, del inglés *Acid-Citrate-Dextrose*), que inhibe la activación plaquetaria. Los componentes del tampón ACD son los siguientes, con un pH de 7.4:

- Ácido cítrico.....39 mM
- Citrato sódico.....75 mM
- Dextrosa.....135 mM

### **4.2.2. Muestras de aorta bovina**

Se obtuvieron segmentos de aorta torácica descendente de vacas procedentes del matadero municipal (Colmenar Viejo). Cada segmento fue cuidadosamente aislado para preservar el endotelio intacto. El aislamiento y manipulación de las muestras se realizaron en condiciones de esterilidad. Se mantuvieron en tampón salino fosfatado del tipo *Dulbecco* atemperado a 37°C.

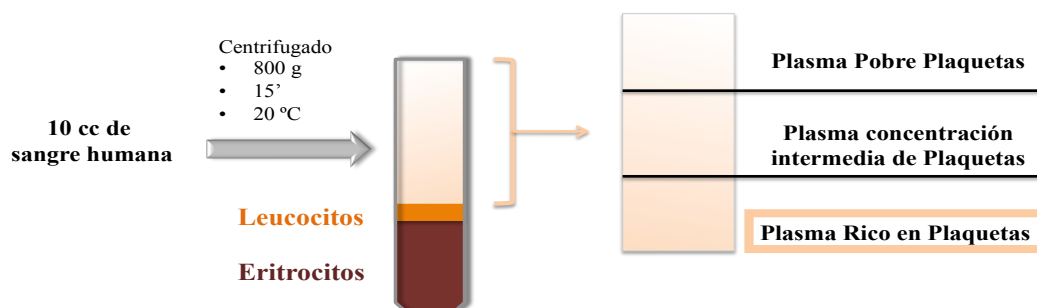
El tampón *Dulbecco* se preparó en el laboratorio en condiciones de esterilidad con los siguientes componentes y concentraciones:

- Cloruro potásico (ClK).....2.6 mmol/l
- Fosfato potásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)..... 1.5 mmol/l
- Cloruro sódico (NaCl).....137 mmol/l
- Fosfato sódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).....8 mmol/l
- Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>).....5.5 mmol/l
- Agua (H<sub>2</sub>O) hasta un litro

### **4.3. AISLAMIENTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS**

La preparación del PRP requiere la separación de las plaquetas y el plasma de los elementos formes sanguíneos. El protocolo para la obtención del PRP ya ha sido publicado con anterioridad<sup>239,245,246</sup>. Para prevenir la activación de las plaquetas, durante el procedimiento se evitaron grandes fuerzas mecánicas como agitación o un pipeteo rápido.

La muestra de sangre se centrifugó durante 15 minutos a 800 g y a 20 °C en la centrífuga tipo *Hettich Universal 320R® (Hettich Zentrifugen)*. Posteriormente, se recolectó el PRP (Fig. 4.1) y se cuantificó el número de plaquetas con un contador celular. Cuando fue necesario, se utilizó plasma pobre en plaquetas (PPP) para diluir el PRP. A su vez, el PPP se obtuvo mediante centrifugación del PRP durante 10 minutos a 2500 rpm.



**Figura 4.1.** Proceso de obtención del plasma rico en plaquetas

#### 4.4. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AORTA

Los segmentos de aorta se cortaron con bisturí en piezas de aproximadamente 1 cm de longitud y fueron preincubadas en placas de Petri con medio RPMI 1640 durante una hora, tanto los segmentos controles como los que posteriormente serían estimulados con  $\text{TNF-}\alpha$ .

##### 4.4.1. Medio de cultivo

El medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 fue inicialmente diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión, pero con los suplementos adecuados tiene un amplio rango de aplicaciones en células de mamíferos.

El medio RPMI empleado pertenece a la compañía *Invitrogen Corporation: Gibco®* RPMI 1640 (nº catal.11835-063), sin rojo fenol, para evitar alteraciones posteriores en los análisis en los que se utilizan métodos colorimétricos. Este medio

está constituido por la formulación basal estándar recogida en publicaciones previas<sup>247</sup>, suplementado con aminoácidos no esenciales y piruvato sódico. Además se suplementó con un 1% de suero fetal bovino (SFB) (al tratarse de tejidos requieren menos SFB que los cultivos celulares), 5 mmol/l de glutamina,  $2 \times 10^{-5}$  µg/l de penicilina y  $2 \times 10^{-5}$  µg/l de estreptomicina. La formulación del medio se indica en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Formulación del medio RPMI 1640 *Gibco*®

COMPONENTES	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mg/dl)	MOLARIDAD (mM)
<b>AMINOÁCIDOS</b>			
Glicina	75	10	0.133
L-Arginina	174	200	1.150
L-Asparagina	132	50	0.379
Ácido L-Aspártico	133	20	0.150
L-Cistina 2HCl	313	65	0.208
Ácido L-Glutámico	147	20	0.136
L-Glutamina	146	300	2.050
L-Histidina	155	15	0.0968
L-Hidroxiprolina	131	20	0.153
L-Isoleucina	131	50	0.382
L-Leucina	131	50	0.382
L-Lisina	146	40	0.274
L-Metionina	149	15	0.101
L-Fenilalanina	165	15	0.0909
L-Prolina	115	20	0.174
L-Serina	105	30	0.286
L-Treonina	119	20	0.168
L-Triptófano	204	5	0.0245
L-Valina	117	20	0.111

<b>VITAMINAS</b>			
<b>Biotina</b>	244	0.2	0.000820
<b>Cloruro de colina</b>	140	3	0.0214
<b>A. pantoténico</b>	477	0.25	0.000524
<b>Ácido fólico</b>	441	1	0.00227
<b>i-Inositol</b>	180	35	0.194
<b>Niacinamida</b>	122	1	0.00820
<b>P-aminobenzoico</b>	137	1	0.00730
<b>Piridoxina</b>	206	1	0.00485
<b>Riboflavina</b>	376	0.2	0.000532
<b>Tiamina</b>	337	1	0.00297
<b>Vitamina B12</b>	1355	0.005	0.0000037
<b>SALES</b>			
<b>Nitrato de calcio</b>	236	100	0.424
<b>Sulfato magnésico</b>	120	48.84	0.407
<b>Cloruro potásico</b>	75	400	5.33
<b>Bicarbonato sódico</b>	84	2000	23.81
<b>Cloruro sódico</b>	58	5300	91.38
<b>Fosfato disódico</b>	142	800	5.63
<b>OTROS</b>			
<b>D-Glucosa</b>	180	2000	11.11
<b>Glutation reducido</b>	307	1	0.00326
<b>HEPES</b>	238	5958	25.03

HEPES: ácido 4-(2-HidroxiEtil)-1-PiperacinaEtanosulfónico.

#### 4.4.2. Protocolo de preincubación de las muestras

Los segmentos de aorta fueron cultivados en atmósfera de 95% de oxígeno (O<sub>2</sub>), 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a 37 °C durante 1 hora y con 1 ml de RPMI. Posteriormente, se lavaron dos veces y se procedió a la incubación con PRP.

#### **4.4.3. Estimulación de las muestras de aorta**

Con el objetivo de inducir un estado inflamatorio, como podría ser el que acontece en la arteriosclerosis, en el mismo experimento, y previo a la incubación con PRP, 33 fragmentos de aorta bovina fueron estimulados (se indujo un estado inflamatorio) incubándolos con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*) durante 6 horas a 37°C en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Este proceso de estimulación se realizó como se ha demostrado en publicaciones previas<sup>220</sup>.

Tras el proceso de incubación se procedió al lavado de las muestras en dos ocasiones consecutivas y a la coincubación con PRP.

#### **4.4.4. Protocolo de coincubación (cocultivos)**

En el experimento de coincubación se utilizaron dos concentraciones de plaquetas: 10<sup>5</sup> plaquetas por pocillo (10<sup>5</sup> plaq/poc), considerada una concentración fisiológica, y 10<sup>7</sup> plaquetas por pocillo (10<sup>7</sup> plaq/poc), que simularía la concentración de plaquetas del trombo plaquetario y, por tanto, una situación patológica. La concentración plaquetaria final se obtuvo diluyendo el PRP con PPP. De esta manera, 10<sup>5</sup> plaquetas se consiguieron diluyendo la concentración de 10<sup>7</sup> plaquetas con PPP.

Se utilizaron 31 segmentos aórticos como controles (18 en el grupo de pared vascular normal y 13 con la pared preestimulada con TNF- $\alpha$ ), los cuales fueron

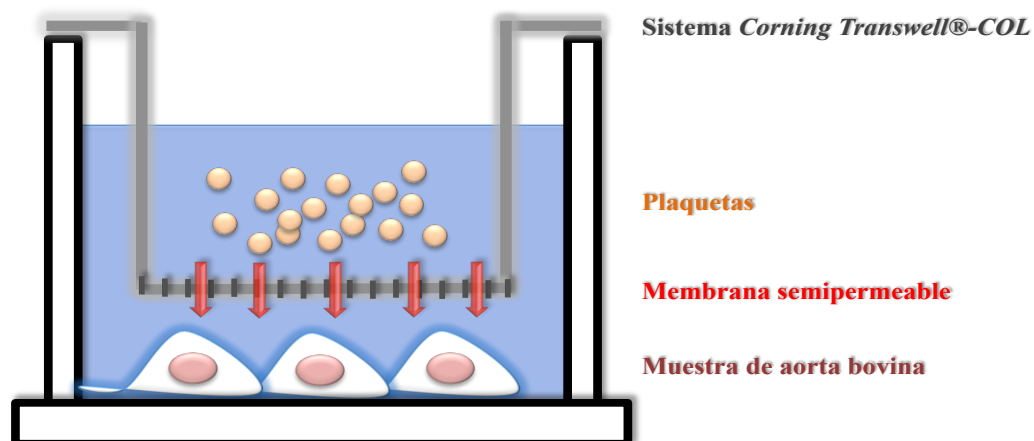
incubados con la misma cantidad de PPP que el volumen final de PRP+PPP añadido a los segmentos de aorta incubados con  $10^5$  plaq/poc.

El sistema de coincubación se preparó utilizando membranas de tipo *Corning®-Transwell®-COL* (*Corning incorporated*, COSTAR 3491, NY). Los sistemas *Corning®-Transwell®-COL* contienen membranas transparentes estériles de PTFE tratadas con colágeno que promueven la fijación y crecimiento celular a la vez que permiten visualizar el proceso de cultivo. Contienen una mezcla equimolar de colágeno tipo I y III derivado de placenta bovina. La descripción de las características se detalla en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Características del sistema *Corning®-Transwell®-COL*.

CARACTERÍSTICA	
Forma pocillo	Redonda
Área de crecimiento celular	4.67 cm <sup>2</sup>
Material	PTFE
Tamaño del poro	0.4 µm
Grosor de la membrana	50 µm
Diámetro de la membrana	24 mm

Este sistema, que contenía las plaquetas, se introdujo en los pocillos donde se depositaron previamente los segmentos de aorta bovina (Fig.4.2). El tamaño del poro utilizado fue de 0.4 µm para evitar la interacción física de las plaquetas con las muestras de aorta, ya que las plaquetas poseen un diámetro medio de 1-3 µm<sup>248</sup>.



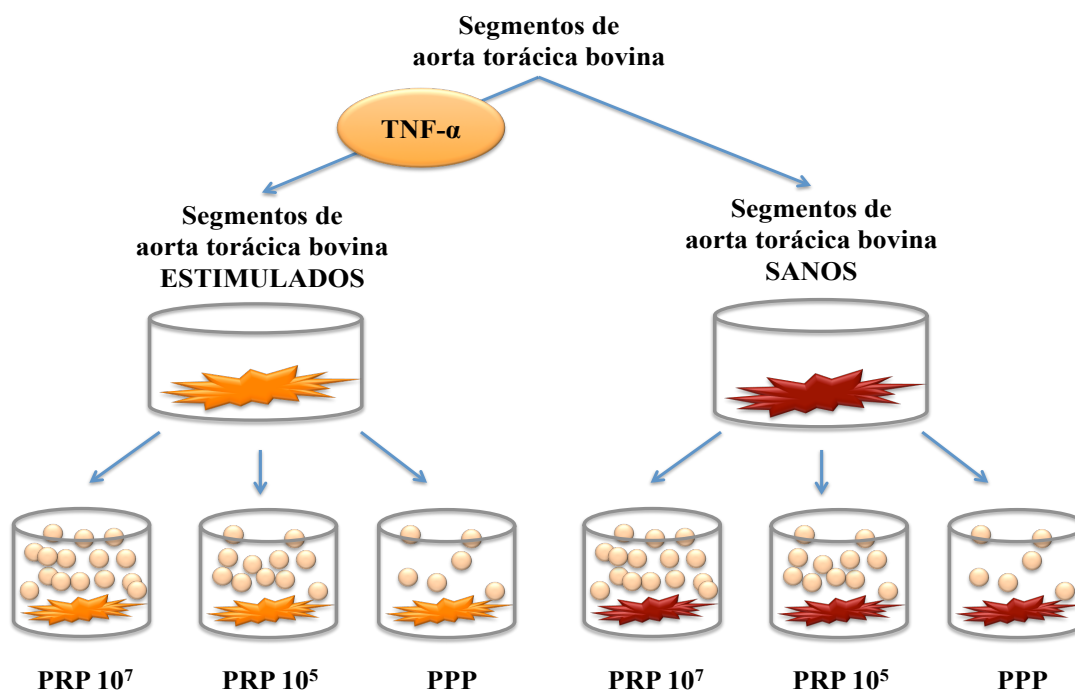
**Figura 4.2.** Sistema Corning®-Transwell®-COL. Esquema del experimento desarrollado con este tipo de sistema en el que no hay contacto directo entre las muestras.

De esta manera, en el sistema de coincubación las plaquetas y las muestras de aorta bovina para el cultivo no estaban en contacto físico, lo que permitió estudiar la interacción entre ellas a través de la liberación de marcadores bioactivos (y no por contacto directo) e hizo posible el posterior procesamiento sólo de los fragmentos de arteria<sup>249</sup> sin contaminación por las plaquetas. Finalmente, en el experimento que fue llevado a cabo se establecieron las siguientes coincubaciones (Fig. 4.3):

- 18 pocillos con segmentos de aorta bovina normal + PPP (control)
- 10 pocillos con segmentos de aorta bovina normal +  $10^5$  plaq/poc.
- 9 pocillos con segmentos de aorta bovina normal +  $10^7$  plaq/poc.
- 13 pocillos con segmentos de aorta bovina preestimulados con  $\text{TNF-}\alpha$  + PPP (control)
- 10 pocillos con segmentos de aorta bovina preestimulados con  $\text{TNF-}\alpha$  +  $10^5$  plaq/poc.



- 10 pocillos con segmentos de aorta bovina preestimulados con  $\text{TNF-}\alpha + 10^7$  plaq/poc.



**Figura 4.3.** Resumen esquemático del modelo experimental.

Todos los experimentos se realizaron con el medio RPMI (Tabla 4.1) suplementado con:

- Suero fetal bovino (SFB).....1%
- Glutamina.....3 mmol/l
- Penicilina..... $2 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/l}$
- Estreptomicina..... $2 \times 10^{-5}$   $\mu\text{g/l}$

La coincubación de cada experimento fue de 1 hora. El hecho de incubar con PRP sólo durante una hora se basó en observaciones previas en las que tiempos

superiores a 1 hora favorecen la activación espontánea de las plaquetas<sup>250</sup>. Transcurrido ese tiempo se retiró el sistema *Corning®-Transwell®-COL* que contenía las plaquetas. Los segmentos aórticos aislados fueron entonces incubados a 37°C durante otras 23 horas más y congelados inmediatamente a -80°C para el posterior análisis proteómico.

#### **4.5. DETERMINACIONES DE PROTEÍNAS MEDIANTE PROTEÓMICA**

Para llevar a cabo este análisis se utilizó la proteómica, que, como ya se ha indicado con anterioridad (ver apartado **1.5. PROTEÓMICA**), es una nueva tecnología que permite analizar la expresión de múltiples proteínas a la vez en una única muestra. En un estudio proteómico es necesario integrar una serie de tecnologías, como la 2-DE, el análisis de la imagen, la MS y la bioinformática, como se muestra a continuación.

##### **4.5.1. Electroforesis bidimensional**

La 2-DE es la base fundamental para el desarrollo de los mapas de expresión proteica o proteomas. Esta técnica permite separar las proteínas en dos dimensiones: el peso molecular y el punto isoelectrico. Esta separación bidimensional de las proteínas da lugar a un mapa de expresión proteica en el que cada proteína y sus isoformas están distribuidas en la coordenada formada por el peso molecular y el punto isoelectrico. Esta coordenada es única para cada proteína, es decir, es el documento de identidad de la misma.

**4.5.1.1. Material utilizado**

- Homogeneizador *Ultra-Turrax®* T8 (IKA®-Werke)
- Tampón de rehidratación
- *kit Pierce®* BCA Protein Assay
- Geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (*Bio-Rad ReadyStrip™*).
- Sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 10%
- Sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*)
- *Fixative Enhance Concentrate* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- *Kit Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Escáner UMAX POWERLOOK III
- *Software ScanMagic V* 4.5
- Programa *Quantity One* 4.2.3 (Laboratorios *Bio-Rad*)

**4.5.1.2. Preparación de las muestras**

Las muestras de aorta fueron aisladas y homogeneizadas con el homogeneizador *Ultra-Turrax®* T8 (IKA®-Werke). Dicho homogeneizador es una unidad de dispersión para conseguir emulsiones y dispersiones con un alto rendimiento. El *Ultra-Turrax®* T8 (Fig. 4.4) es un instrumento de mano de alta calidad, con una potencia de hasta 100 watios y unas velocidades de 5000 a 25000 rpm. Gracias al

amplio rango de velocidades y que el elemento dispersor tiene un diámetro de 5-8 mm, incluso pequeñas cantidades se procesan y dispersan rápidamente.



**Figura 4.4.** Ejemplo del instrumento *Ultra-Turrax®* T8. Fuente: internet.

Las muestras se homogeneizaron en una solución tampón (*rehydration buffer*) que contenía un agente desnaturalizante (urea), un agente detergente (CHAPS y anfolitos) y un agente reductor (ditiotreitól) en las concentraciones que se exponen a continuación (Tabla 4.3):

- Urea.....8 mol/l
- CHAPS w/v.....2%
- Ditiotreitól.....40 mmol/l
- Anfolitos Bio-Lyte (Laboratorios *Bio-Rad*, Hercules, Cal)...0.2%
- Azul de bromofenol w/v.....0.01%

**Tabla 4.3.** Componentes, función y concentración de la solución de rehidratación.

COMPONENTE	FUNCIÓN	CONCENTRACIÓN
Urea	Desnaturaliza y solubiliza las proteínas	8 M/l
Detergente (CHAPS)	Solubiliza las proteínas y ayuda a mantenerlas en solución durante la	2%

	rehidratación y 2-DE		
<b>Agente reductor (ditiotreititol)</b>	Rompe los puentes disulfuro en las proteínas	40 mM	
<b>Anfolitos</b>	Ayudan a solubilizar las proteínas y a mantener el gradiente de pH entre 0.2- 2%	0.2%	

Posteriormente, los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -80 °C hasta su análisis.

#### 4.5.1.3. Primera dimensión

La concentración de proteínas se estimó utilizando el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Se trata de una formulación basada en el ácido bicinconínico (BCA), compatible con detergentes, para la detección colorimétrica y cuantificación de las proteínas totales.

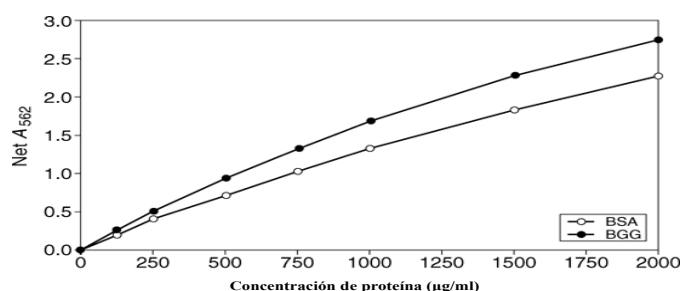
El principio del método del ácido bicinconínico (BCA), patentado por *Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)*, es similar al procedimiento de *Biuret*, en cuanto que ambos se basan en la formación de un complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$  <sup>251</sup>. La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. El BCA forma un complejo azul púrpura con el  $\text{Cu}^{1+}$  por proteínas en medios alcalinos, de modo que permite monitorizar la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  por las proteínas a un máximo de absorbancia de 562 nm y de este modo cuantificar las proteínas. La estructura macromolecular de la proteína, el número de uniones peptídicas y la presencia de cuatro aminoácidos en particular (cisteína,

cistina, triptófano y tirosina) han sido descritos como los responsables de la formación de color con BCA. La concentración de proteínas se determina en referencia generalmente a una proteína estándar común, como la albúmina bovina.

El ensayo BCA es más sensible y aplicable que los métodos de *Biuret* o de *Lowry*. Además, tiene menos variabilidad que el método de *Bradford*. Entre otras características del ensayo BCA encontramos:

- Método colorimétrico, se lee a 562 nm
- Compatible con la mayoría de los detergentes iónicos y no iónicos
- Más rápido y fácil que el método de *Lowry*
- Todos los reactantes son estables a temperatura ambiente durante 2 años
- El rango de trabajo varía de 20 a 2000 µg/ml
- El complejo de color es estable
- Adaptable a microplatos
- Menor variación proteína-a-proteína que con los métodos de tinción
- Es aplicable a un amplio rango de concentraciones de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con referencia al estándar, la albúmina bovina (Fig. 4.5).



**Figura 4.5.** Ejemplo de curva de comparación de concentración de proteínas frente a la albúmina bovina. **BSA:** albúmina de suero bovino. **BGG:** gammaglobulina bovina. Fuente: internet.

La cuantificación de las proteínas se realizó siguiendo los pasos que se indican a continuación:

1. Preparación de las diluciones estándar de BSA (albúmina de suero bovino).

Las diluciones de BSA se prepararon a partir de ampollas de BSA de 2.0 mg/ml, según el siguiente esquema (Tabla 4.4):

**Tabla 4.4.** Diluciones de BSA indicando el volumen de disolvente, la relación volumen/fuente de BSA y la concentración final de BSA. BSA: albúmina de suero bovino.

VIAL	VOLUMEN DE DISOLVENTE	VOLUMEN/FUENTE DE BSA	CONCENTRACIÓN FINAL BSA
A	700 µl	100 µl del estándar	250 µg/ml
B	400 µl	400 µl del vial A	125 µg/ml
C	450 µl	300 µl del vial B	50 µg/ml
D	400 µl	400 µl del vial C	25 µg/ml
E	400 µl	100 µl del vial D	5 µg/ml
F	400 µl	0	0 µg/ml (blanco)

2. Preparación del reactivo de trabajo BCA

Se empleó como reactivo el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Para determinar el volumen total de reactivo de trabajo se empleó la siguiente fórmula: (x estándar + x muestras problema) x (nº duplicados) x (volumen de reactivo de trabajo por muestras= 200 µl)= volumen total. El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50

partes de reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicincínico y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1 M) con una parte de reagente B (sulfato cúprico 4%).

3. Se pipetearon 25  $\mu$ l de cada estándar o muestra problema por triplicado en pocillos
4. Se añadieron 200  $\mu$ l de reactivo de trabajo a cada pocillo y se mezcló el platillo en un agitador durante 30 segundos.
5. Se tapó el platillo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos
6. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente
7. Se midió la absorbancia a 562 nm
8. Se restó la absorbancia de la muestra blanco al resto de muestras
9. Se preparó la curva estándar: en el eje de ordenadas la medida de absorbancia; en el eje de abscisas, la concentración conocida de BSA. A continuación, en esta curva se interpolan los valores obtenidos en el resto de muestras problema.

Para la primera dimensión de la 2-DE se cargaron muestras de 250  $\mu$ g de proteína total en tiras de geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un pH de 3 a 10 (*Bio-Rad ReadyStrip™*). El foco isoelectrico se realizó con el sistema PROTEAN® IEF cell (Laboratorios *Bio-Rad*) durante tres días y a temperatura ambiente (20°C). Este sistema está diseñado para llevar a cabo la primera dimensión y consiste en una fuente de alimentación programable con una plataforma *Peltier* que mantiene la temperatura constante para asegurar la reproducibilidad. El rango de temperaturas varía desde 10 a 25 °C, lo que permite trabajar con un rango más amplio de muestras de proteínas y condiciones. Dicho sistema permite acomodar hasta 24



tiras de 7 cm o 12 de 17 cm para realizar el foco isoelectrico. Puede ser programado completamente para una rehidratación pasiva o activa (50 V). Las especificaciones técnicas se listan en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5.** Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® IEF cell (Laboratorios *Bio-Rad*).

RENDIMIENTO	
Voltaje	50-10000 V, incrementos de 10 V
Corriente	0-2.4 mA, incrementos de 1.0 $\mu$ A
Potencia	0-24 W
PLATAFORMA <i>Peltier</i>	
Capacidad	24 tiras de 7 cm o 12 toras de 11,17,18 o 24 cm.
Temperatura de operación	10-25 °C
Dimensiones	28 x 30 x 14 cm

Como se ha publicado con anterioridad<sup>221,227</sup>, los geles fueron rehidratados activamente a 50 V durante 60 horas, seguido de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje, limitados por una corriente máxima de 50  $\mu$ A por gel<sup>252</sup>.

#### 4.5.1.4. Segunda dimensión

En la segunda dimensión las proteínas de las tiras se separaron según su peso molecular en geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico al 10% (SDS-PAGE) utilizando el sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*). Esta unidad proporciona una gran área de separación de las proteínas, lo que permite analizar muestras con mayor carga y, finalmente, también obtener una mejor

resolución respecto a los formatos de gel más pequeños. Las especificaciones técnicas se incluyen en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6.** Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*).

SISTEMA PROTEAN® II XL	
Número de geles	1-4
Tamaño del gel	18.3 x 20 cm (altura x longitud)
TAMAÑO del PLATO	
Interno	20 x 20 cm
Externo	20 x 22.3 cm
Longitud del espaciador	22.3 cm
Volumen superior de tampón	350 ml
Volumen inferior de tampón	1.2 L
TIEMPOS para el SDS-PAGE	
Sin enfriamiento	5 h
Con enfriamiento	3.5 h

#### 4.5.1.5. Tinción

Posteriormente, los geles fueron fijados en una solución con *Fixative Enhance Concentrate* (Laboratorios *Bio-Rad*), etanol y ácido acético en agua destilada durante 20 minutos. Después se utilizó una solución de sensibilización compuesta por acetato sódico y tiosulfato sódico en agua destilada y se lavaron dos veces de 10 minutos con agua destilada. Entonces los geles fueron teñidos con plata utilizando el kit *Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante 25 minutos.

El *Silver Stain Plus* es un sistema rápido y sencillo para detectar proteínas en los geles de poliacrilamida tras la electroforesis. Esta tinción con plata es muy sensible, pudiendo detectar incluso cantidades de nanogramos de proteínas. El *kit Silver Stain Plus* contiene los siguientes componentes:

- Concentrado potenciador del fijador
- Solución de complejo de plata, que contiene  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{AgNO}_3$
- Ácido tungstosilícico, compuesto por silicio y tungsteno ( $\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y que a 20 °C es completamente soluble
- Formaldehído
- Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) como agente acelerador de la tinción
- Un bote de 1 L vacío

Para la correcta tinción de los geles los contenedores se limpiaron con 50% de ácido nítrico después del detergente de laboratorio. Además, las superficies de los geles estuvieron completamente sumergidas y se evitaron temperaturas superiores a 25 °C. Los geles teñidos se lavaron dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada vez.

Es muy importante destacar que la tinción con plata utilizada fue compatible con posteriores pasos de MS. El siguiente paso fueron dos lavados con agua destilada de un minuto de duración cada uno para seguidamente aplicar la solución de revelado compuesta de carbonato sódico y formaldehído en agua destilada. Una vez que los

geles alcanzaron el grado de tinción deseado se paró el proceso mediante el empleo de una solución con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua destilada.

#### 4.5.1.6. *Adquisición de imágenes y análisis*

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando un escáner UMAX POWERLOOK III operado por el software *ScanMagic V 4.5*. El análisis de la imagen se realizó utilizando el programa *Quantity One 4.2.3* (Laboratorios *Bio-Rad*) (Fig. 4.6). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas. A la intensidad del volumen de cada punto le fue sustraída la intensidad correspondiente al fondo y el volumen resultante fue normalizado *in situ* con el valor densitométrico correspondiente a la actina  $\alpha$ .



**Figura 4.6.** Ejemplo de pantalla de análisis con el programa *Quantity One*.

La identidad de cada punto se realizó por comparación con la base de datos *Swiss Prot* (ExPASy). La densidad de los puntos estudiados más importantes se confirmó con MS.

En el mapa proteómico de los segmentos de aorta bovina se analizaron densitométricamente y se identificaron por comparación con aquellos encontrados en la vena safena humana, publicado por *McGregor et al* (2001)<sup>215</sup>. Los *spots* en los que se observaron diferencias significativas se identificaron con MS.

#### **4.5.2. Espectrometría de masas**

La MS es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas.

##### **4.5.2.1. Material utilizado**

- Agua *Milli-Q™* (*Merk Millipore*)
- Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) al 100%
- Sistema *SpeedVac®* (*Thermo Scientific*)
- Ditiogeritritol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ )
- Bicarbonato amónico ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )
- Iodoacetamida ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ )
- Tripsina (*Promega®*)
- Ácido trifluoroacético (TFA,  $\text{CF}_3\text{COOH}$ )
- Puntas mmol-18 *Zip* (*Millipore*)

- Matriz de  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*)
- Placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*)
- 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem*)
- Calibradores estándar (*Applied Biosystem*)

#### 4.5.2.2. Método

Para la identificación de las proteínas de interés, los puntos se extrajeron manualmente de los geles utilizando un punzón para biopsias<sup>253,254</sup>. La identificación de cada proteína se llevó a cabo extrayendo el mismo punto de interés en tres geles diferentes. La tinción de plata fue solubilizada y eliminada y los puntos fueron lavados tres veces con agua *Milli-Q™* (*Merk Millipore*). Con este sistema se puede obtener agua ultrapura para este tipo de aplicaciones en el laboratorio, teniendo las siguientes características: un nivel de resistividad de 18,2 MegaOhmios.cm a 25 °C y un nivel de carbonato orgánico total inferior a 10 ppb. Los sistemas *Milli-Q™* constan de varias etapas de purificación, cada una de ellas diseñada para eliminar una determinada gama de contaminantes. Se utilizó el módulo Gradient A10 (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.** Especificaciones del agua producida por el sistema *Milli-Q™* Gradient A10.

ESPECIFICACIONES	
Resistividad (M $\Omega$ .cm) a 25 °C	18.2
Nivel de COT (valores típicos)	1-5
Nivel de pirógenos (Eu/ml)	NE
Bacterias (UFC/ml)	<1

Partículas > 0.22 $\mu\text{m}$ (P/ml)	<1
Caudal (L/min)	1.5

Después las muestras se incubaron con acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), utilizado como disolvente, al 100% durante 5 minutos y otros 30 minutos con ácido trifluoroacético (TFA, del inglés *TriFluoroAcetic acid*, con la fórmula  $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) al 5% y acetonitrilo al 50% y se secaron con un sistema *SpeedVac*<sup>®</sup> (*Thermo Scientific*).

Como se ha publicado previamente<sup>252</sup>, las muestras se redujeron con ditioeritritol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ ) en bicarbonato amónico ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) y posteriormente fueron alquiladas con iodoacetamida ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ ), un inhibidor irreversible de todas las cisteína peptidasas (mediante el mecanismo de alquilación de los residuos catalíticos de la cisteína), en bicarbonato amónico. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12.5 ng/ $\mu\text{l}$  de tripsina (*Promega*<sup>®</sup>) en 25 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.5) a 37°C durante toda la noche.

La tripsina utilizada es una enzima peptidasa de origen porcino, modificada mediante metilación, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos lisina (Lys) y arginina (Arg). Su actividad máxima se establece a un pH entre 7 y 9 y se inactiva de forma reversible a un pH de 4.

Tras la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución de 100 mmol/l de bicarbonato amónico. Estos extractos se liofilizaron y resuspendieron en TFA al 0.1%. Los péptidos se purificaron usando puntas mmol-18 Zip (*Millipore*).

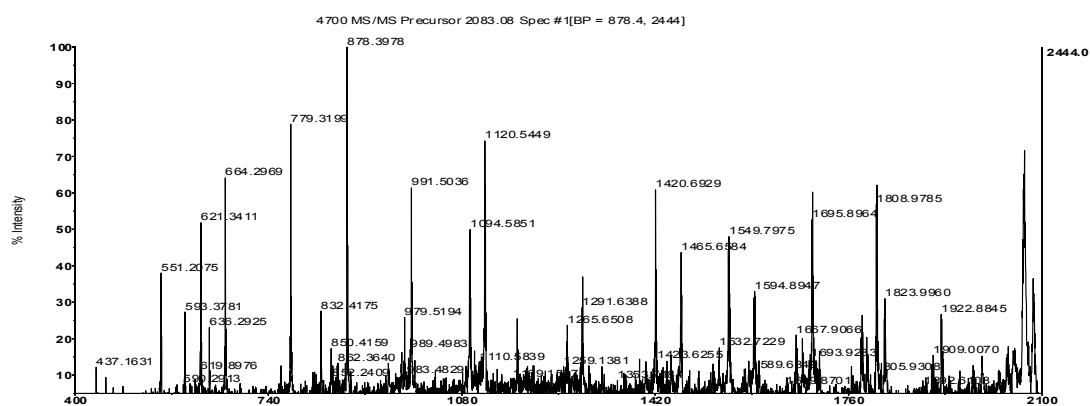
Para la MS se mezcló 1  $\mu$ l de los extractos purificados con 1  $\mu$ l de matriz de  $\alpha$ -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*) en acetonitrilo al 50%. Un microlitro de esta mezcla se cargó en una placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*, del inglés *Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en dos partes: la fuente de iones y el detector. La fuente de ionización MALDI se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (TOF-*Time of Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ion padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

La MS se realizó utilizando el aparato 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem*) y el análisis se efectuó en modo reflector positivo. Todos los espectros de masas se calibraron usando una mezcla de calibradores estándar (*Applied Biosystem*). Con el análisis en modo MS obtuvimos un espectro de masas denominado “huella peptídica” (Fig. 4.7), y algunos de los péptidos observados se analizaron en modo MS/MS, como se ha publicado anteriormente<sup>252</sup>. El modo MS/MS obtiene espectros de fragmentación de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. Los péptidos con una relación señal-ruido mayor de 20 se consideraron en la base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) para la identificación de la proteína.



Para llevar a cabo dicha identificación se utilizó la base de datos *Mascot* 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) como algoritmo para comparar los péptidos obtenidos por MS.



**Figura 4.7.** Ejemplo de espectro de masas moleculares de la anaxina A2: huella peptídica.

La base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) es una potente máquina de búsqueda para identificar proteínas de bases de datos primarias. Nos permitió integrar todos los métodos de búsqueda probados: la huella peptídica o los fragmentos derivados del modo MS/MS.

Tras analizar la mezcla de péptidos mediante MS obtuvimos un conjunto de valores de masas moleculares que cruzamos con la base de datos *Mascot*. Para cada entrada en la base de datos de proteínas la máquina simula la rotura de los enlaces específica de la tripsina utilizada en la digestión de las proteínas, calcula las masas de los péptidos previstos y compara el conjunto de valores de masas calculadas con los obtenidos de forma experimental. Para realizar la búsqueda se introdujo el espectro y después de un corto período de tiempo se recibieron los resultados.

### **4.5.3 *Western blot***

Se analizó mediante *western blot* (WB) la expresión de las proteínas triosa fosfato isomerasa, fructosa 1,6-bifosfato aldolasa y la cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa mitocondrial en las muestras de aorta bovina, como se detalla a continuación.

El WB, o *immunoblot*, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, como puede ser una mezcla compleja de proteínas (un extracto tisular). Mediante la electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

#### **4.5.3.1. *Material empleado***

- Papel de filtro
- Tampón *Laemmli* (1x)
- SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfato PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis*) al 15%
- PBS para lavado
- Ácido bicinonínico (BCA)

- Azul de *Coomasie*
- Membrana de nitrocelulosa de polifluoruro de vinilideno (PVDF)
- Albúmina de suero bovino (BSA)
- Tampón TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*)
- Anticuerpos primarios
  - Anti-Triosa-fosfato isomerasa (TIM (FL-249):sc-30145)
  - Anti-Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (Aldolasa A (N-15):sc:12059)
  - Anti- $\alpha$ -ATP sintasa mitocondrial (ATP5A (15H4):sc-58613)
- Anticuerpos secundarios
  - IgG anti-ratón (*General Electric Healthcare®*)
  - IgG anti-conejo (*Santa Cruz Biotechnology®*)
  - IgG anti-cabra (*General Electric Healthcare®*)
- *Kit ECL plus* (*Amersham*, cod. RPN 2132)
- Marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich*, *St Louis*, MI, USA)

#### 4.5.3.2. Preparación de las muestras

Los tejidos homogeneizados se solubilizaron en el tampón *Laemmli*, que contiene 2-mercaptoetanol. El tampón *Laemmli* está especialmente formulado para la preparación de muestras proteicas en los geles de poliacrilamida. La formulación de dicho tampón es la siguiente, con un pH de 6.8, aproximadamente:

- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).....4%
- Glicerol.....20%

- 2-mercaptoetanol.....10%
- Azul de bromofenol.....0.004%
- M Tris-HCl.....125 mM

El agente detergente SDS dota a todas las proteínas de carga positiva en un intervalo regular, confiriendo a cada proteína la misma carga negativa total. De esta manera podemos separar las proteínas por su tamaño y no por su carga. El SDS también desnatura las proteínas y sus subunidades para ayudar a la separación en base al tamaño y no a la forma. Al añadir glicerol en el tampón se incrementa la densidad, consiguiendo que la muestra descienda hasta el fondo y minimizando, por tanto, pérdidas de proteína en el tampón. El 2-mercaptoetanol se utiliza para reducir los enlaces disulfuro intra e intermoleculares y permitir una adecuada separación no por forma sino por tamaño. A su vez, el azul de bromofenol sirve como indicador de la muestra de proteínas, haciendo más fácil su visualización. El *Tris*, es un componente habitual de los tampones y representa la abreviación del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano, con la fórmula  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ . Posee una constante de disociación ( $\text{pK}_a$ ) de 8.07 a 25 °C, lo que implica que dicho tampón va a tener una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y así simularemos las condiciones fisiológicas del animal o del cuerpo humano.

#### ***4.5.3.3. Electroforesis en gel***

Las proteínas se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida o SDS-PAGE al 15% (w/v).

En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína (20 µg/pocillo), calculado mediante la reacción colorimétrica basada en la reacción del BCA (*Pierce*) (Véase apartado **3.5.1.3. Primera dimensión**). Para asegurarnos de que cargábamos la misma cantidad de proteínas en el gel, se elaboró otro gel paralelo con muestras idénticas que posteriormente se tiñó con azul de *Coomassie* (colorante derivado del fenilmetano,  $C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$ ). La solución de tinción contenía los siguientes componentes:

- Azul de *Coomassie*.....0.5 g
- Metanol.....250 ml
- Ácido acético.....50 ml
- Agua destilada hasta 500 ml.

Tras dos horas en contacto con la solución se procedió a desteñir la membrana con ácido acético y metanol.

#### **4.5.3.4. Transferencia y bloqueo de las proteínas**

La transferencia de proteínas o *blotting* consiste en la inmovilización de dichas proteínas sobre membranas sintéticas para, a continuación, detectarlas mediante sistemas de tinción. En la técnica WB, después de la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

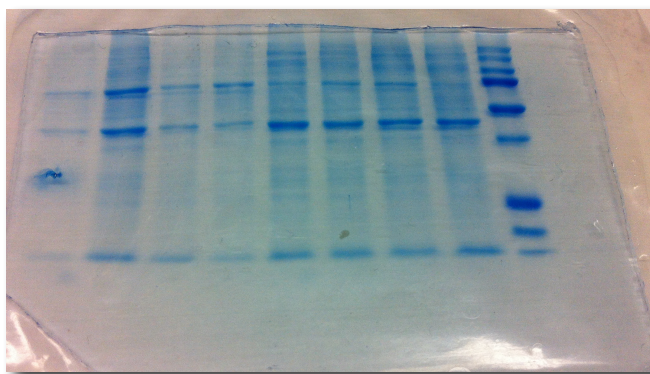
Cualquier procedimiento de *blotting* consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de las proteínas sobre la membrana, ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión...) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
3. Incubación del *blot* con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del *blot* con anticuerpos secundarios, o reactivos, que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Incubación con los sustratos apropiados en aquellas bandas de proteínas marcadas con enzimas para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

El trabajo con proteínas fijadas sobre una membrana, en lugar de gel, tiene una serie de ventajas: son más rápidas de teñir y desteñir, se detectan cantidades menores de proteínas (pues se concentran en la superficie) y no se diluyen en todo el espesor del gel. Además, las membranas son más fáciles de manipular que el propio gel.

Las proteínas fueron transferidas por electrotransferencia semihúmeda desde el gel de poliacríamida a una membrana de nitrocelulosa (*Immobilion®-P*, Millipore), para lo que se utilizó un tampón de transferencia (250 mM de glicina, 15% de metanol, 25 mM de *Tris* y agua destilada). Las membranas de tipo *Immobilion®-P* presentan una gran adsorción a las proteínas, por lo que se evita la pérdida de las mismas durante la transferencia. Su estructura es de poro abierto, lo que facilita el

acceso a las proteínas unidas o eliminar las que no lo han hecho. Los poros tienen un diámetro de 0.45  $\mu\text{m}$ , por lo que pueden utilizarse en la mayoría de los WB, especialmente para proteínas de  $> 20 \text{ kD}$  (Fig. 4.8). Se sometieron a 20 V durante una hora. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con metanol seguido de un tampón neutro (PBS), depositándose sobre el papel de filtro.



**Figura 4.8.** Imagen de una membrana de nitrocelulosa (*Immobilion®-P*, Millipore).

Dado que la membrana necesita poder unirse a proteínas de forma inespecífica, dichas membranas fueron bloqueadas (se bloquearon los lugares de unión que quedaron libres tras la transferencia) durante toda la noche a 4 °C con un 5% (w/v) de leche en polvo no grasa en TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*). En caso contrario, los anticuerpos empleados en la detección, de naturaleza proteica, podrían unirse a ellos dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se forma con la proteína que se busca.

El TBS-T es un tampón utilizado para mantener el pH en un rango relativamente estrecho. La formulación utilizada fue la siguiente:

- Tris-HCl (pH 5.2).....20 mmol/l

- NaCl.....137 mmol/l
- *Tween*-20.....0.1%

El *Tris*, como se ha mencionado anteriormente, tiene una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y así simular las condiciones fisiológicas del animal o del cuerpo humano. Al añadir ácido clorhídrico (HCl) podemos ajustar el pH hasta 5.2. El NaCl proporciona una concentración de sal isotónica. El polisorbato 20 o monooleato de Polioxietileno Sorbitan, conocido comercialmente como *Tween* 20, es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea utilizado como detergente y emulsionante. En el experimento actual, lo utilizamos para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos.

#### 4.5.3.5. *Detección de proteínas*

Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 12 horas a 4° C con anticuerpos monoclonales específicos unidos a una enzima que, en presencia de su sustrato, catalizó una reacción colorimétrica, haciendo patente la unión con el antígeno (la proteína) y su localización. Las proteínas de interés y los anticuerpos (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU) utilizados se resumen en la Tabla 4.8.

**Tabla 4.8.** Proteínas analizadas y sus anticuerpos específicos.



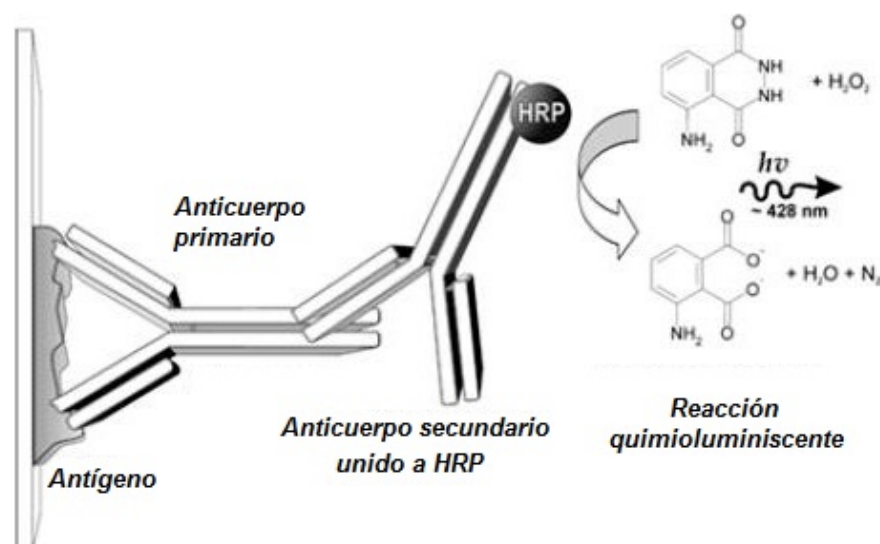
ENZIMA	ANTICUERPO	DILUCIÓN
<b>Triosa fosfato isomerasa</b>	TIM (FL-249): sc-30145	1:500
<b>Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa</b>	Aldolasa A (N-15): sc-12059	1:500
<b><math>\alpha</math>-ATP sintasa mitocondrial</b>	ATP5A (15H4): sc-58613	1:2000

La triosa fosfato isomerasa (TPI), enzima implicada en la glucólisis, cataliza la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. Se utilizó el anticuerpo TIM (FL-249): sc-30145 (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU), una IgG policlonal de conejo obtenida contra los aminoácidos 1-249 (que representan la total longitud de la TPI de origen humano). Cada vial contiene 200  $\mu$ g/ml de IgG en 1.0 ml de PBS con < 0.1% de sodio y 0.1 % de gelatina.

La fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, otra enzima implicada en la glucólisis, cataliza la escisión del fructosa-1,6-bifosfato en dos triosas, la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato. También cataliza la rotura reversible de la fructosa-1-fosfato en gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato. En el ser humano se conocen tres isoenzimas (A-muscular, B-hepática y C-cerebral) codificadas por tres genes diferentes, que se expresan de forma diferente durante el desarrollo y resultan en diferentes actividades sobre los dos sustratos (fructosa-1,6-bifosfato y fructosa-1-fosfato). En nuestro experimento, para la detección de la enzima se utilizó una IgG policlonal de cabra (Aldolasa A (N-15): Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU) como anticuerpo específico para la isoforma A (muscular). Cada vial contiene 200  $\mu$ g/ml.

El complejo ATP sintasa es una enzima situada en la membrana interna de las mitocondrias encargada de sintetizar ATP a partir de ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por un flujo de protones (fosforilación oxidativa). Para su detección se utilizó la IgG<sub>2b</sub> monoclonal de ratón cuyo antígeno es la ATP5A (cadena  $\alpha$ ) de origen bovino. Cada vial contiene 100  $\mu$ g de IgG<sub>2b</sub> in 1.0 ml de PSB con > 0.1% sodio y 0.1% de gelatina.

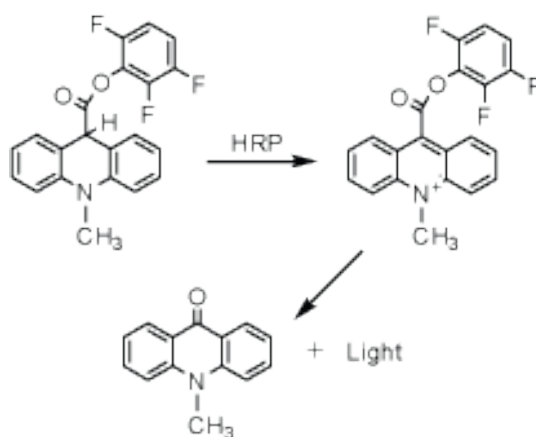
Las membranas se lavaron con PBS al 0.5% de *Tween* (tres veces durante 5 minutos) para eliminar el anticuerpo primario no unido y, después, fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, que reconocían de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios fueron de origen animal: Ig G anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra, conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:2000 (Fig. 4.9).



**Figura 4.9.** Detección de proteínas mediante la técnica *Western Blot*. **HRP**: peroxidasa de rábano.

4.5.3.6. *Análisis*

Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia mejorada y se evaluaron por densitometría<sup>255</sup>. Para la detección de proteínas por quimioluminiscencia se utilizó el sistema ECL<sup>®</sup> (*Amersham Biosciences*), previo lavado con PBS. Consiste en un sustrato Lumigen<sup>®</sup> PS-3 que es convertido en un éster de acridinio cuando es catalizado por la peroxidasa de rábano. El éster reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas y emite luz. El *kit* incluye la Solución A (sustrato que contiene el tampón *Tris*) y la Solución B (sustrato del acridinio con dioxano y etanol). Las dos soluciones se mezclan en una proporción 40:1 (Fig. 4.10).



**Figura 4.10.** Esquema del proceso químico de la quimioluminiscencia.

Inmediatamente después de la oxidación se leyó a 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción.

Para la quimioluminiscencia se requirió la incubación de las membranas con el sustrato (ECL o luminol), para la posterior emisión de luminiscencia al ser expuesto

al *reporter* que trae unido el anticuerpo secundario. La luz emitida fue captada por una cámara CCD, que tomó una imagen digital del WB.

La imagen se analizó por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantificar el resultado en términos de densidad óptica (*Quantity One®*, Laboratorios *Bio-Rad*). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas.

Se utilizaron marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich*, *St Louis*, MI, USA) para el cálculo de la masa molecular, para monitorizar el progreso en la electroforesis y como control positivo para el análisis. Existe una gran variedad de marcadores de peso molecular para numerosas proteínas. En nuestro experimento utilizamos marcadores preteñidos, que contenían una mezcla liofilizada de proteínas con un rango de peso molecular entre 10.000-250.000 Da.

#### **4.6. DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

La actividad de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa se determinó en la propia pared vascular siguiendo el método descrito por *Misset* y *Oppendoes*<sup>256</sup>.

El método de *Misset* y *Oppendoes* fue publicado en 1984 para la purificación simultánea de la hexoquinasa, la fructosa bifosfato aldolasa, la triosa fosfato isomerasa y la fosfo-glicerato quinasa del *Trypanosoma brucei*. Todas las enzimas

fueron estudiadas a 25°C en un volumen final de 1 ml utilizando cubetas de plástico (*Kartell-Milan*). Utilizaron un tampón con trietanolamina/HCl 0.1 M (pH 7.6) en todos los casos, mientras los otros reactantes se añadieron 20 veces más concentrados y se congelaron a -30°C. Las concentraciones de los reactantes en cada ensayo para las respectivas enzimas fueron los siguientes:

Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa:

- Enzima.....1 mM
- NADH.....300  $\mu$ M
- EDTA.....1 mM
- Triosa fosfato isomerasa/ml.....5  $\mu$ g
- Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>)/ml.....50  $\mu$ g

Triosa fosfato isomerasa:

- D-gliceraldehído fosfato.....0.4 mM
- NADH.....300  $\mu$ M
- Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>)/ml.....50  $\mu$ g

Se midió el cambio de absorbancia a 340 nm durante un máximo de diez minutos. Se consideró una unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto a 25°C.

#### 4.6.1. Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa

Se tomaron 240 µg de proteínas totales de los segmentos vasculares y se incubaron con los siguientes elementos:

- *Tris*-HCl (pH7.4).....100 mmol/l
- Solución de fructosa 1,6-bifosfato.....58 mmol/l
- β-nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) .....4.0 mmol/l
- α-glicerofosfato deshidrogenasa/triosa fosfato isomerasa....50U/ml

El *Tris*-HCl (T-1503, *Sigma-Aldrich*) se utilizó para mantener el pH en 7.4. La actividad aldosa se determinó a 340 nm y 25°C en cubetas de plástico con la solución formada por la fructosa 1,6-bifosfato (F-0752, *Sigma-Aldrich*), el sustrato β-NADH (N-8129, *Sigma-Aldrich*) y la α-glicerofosfato deshidrogenasa/triosa fosfato isomerasa (G-6755, *Sigma-Aldrich*) para evitar que se saturase la muestra. Para ello se utilizó el espectrofotómetro *BioAquarius* (CECIL®), observando cada 30 segundos el cambio en la absorbancia hasta completar diez minutos. De esta manera se determinó la disminución progresiva del sustrato NADH en el tiempo.

#### 4.6.2. Triosa fosfato isomerasa

Se tomaron 240 µg de proteínas totales de los segmentos vasculares y se incubaron con los siguientes elementos:

- *Tris*-HCl (pH7.4).....100 mmol/l
- Gliceraldehído-3-fosfato.....58 mmol/l
- $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido (NADH)...4.0 mmol/l
- $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa/aldolasa.....500 U/ml

El *Tris*-HCl (T-1503, *Sigma-Aldrich*) se utilizó para mantener el pH en 7.4. La actividad triosa-fosfato se determinó a 340 nm y 25°C en cubetas de plástico con la solución formada por la gliceraldehído-3-fosfato (G-5251, *Sigma-Aldrich*), el sustrato  $\beta$ -NADH (N-8129, *Sigma-Aldrich*) y la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa/aldolasa (A-2714, *Sigma-Aldrich*) para evitar que se saturase la muestra. Para ello se utilizó el mismo espectrofotómetro, observando cada 30 segundos el cambio en la absorbancia hasta completar diez minutos. De esta manera se determinó la disminución progresiva del sustrato NADH en el tiempo.

#### 4.7. DETERMINACIONES DEL CONTENIDO DE PIRUVATO

El contenido de piruvato presente en los segmentos de aorta bovina fue cuantificado utilizando el *Pyruvate Assay Kit* (K609-100, *BioVision Research Products*, USA). En el ensayo el piruvato es oxidado por la piruvato oxidasa mediante reacciones enzimáticas que generan color ( $\lambda=570$  nm) y fluorescencia (Ex/Em=535/587 nm). El color/fluorescencia es proporcional al contenido de piruvato de la muestra. Las principales características del *Pyruvate Assay Kit* son:

- Detección basada en la absorbancia (570 nm) o fluorescencia

- Permite utilizar muestras de cultivos celulares y tisulares, orina, plasma, suero, así como otros fluidos.
- Detección de 1 a 200  $\mu\text{M}$  de piruvato.
- Método sencillo con una duración de unos 40 minutos

El *Pyruvate Assay Kit* contiene los componentes que se especifican en la tabla a continuación:

**Tabla 4.9.** Componentes del *Pyruvate Assay Kit*.

COMPONENTES	100 ENSAYOS	COLOR	NÚMERO
Buffer <i>Pyruvate Assay</i>	25 ml	WM	K609-100-1
Sonda <i>Pyruvate</i>	200 $\mu\text{l}$	Rojo	K609-100-2A
Mezcla enzimática <i>Pyruvate</i>	Liofilizado	Verde	K609-100-4
Piruvato estándar (100 nmol/ $\mu\text{l}$ )	100 $\mu\text{l}$	Amarillo	K609-100-5

Para medir la concentración de piruvato mediante el ensayo colorimétrico se utilizaron 80  $\mu\text{g}$  de cada homogeneizado de proteínas y se siguieron las instrucciones del fabricante:

1. Preparación de los reactivos:

- La sonda *Pyruvate* se calentó hasta los 37 °C durante 1-2 minutos hasta fundir la solución. Se mezcló bien y se evitó la exposición a la luz y humedad.
- La mezcla enzimática *Pyruvate* se disolvió con 220  $\mu\text{l}$  del *buffer Pyruvate Assay*.

2. Protocolo del ensayo:



- Primero se preparó la curva estándar del ensayo colorimétrico, diluyendo el piruvato estándar hasta 1 nmol/μl al añadir 10 μl del estándar a 990 μl del tampón. Posteriormente, se mezcló bien.
- Después se prepararon las muestras para el ensayo en 50 μl/pocillo de tampón en un plato de 96 pocillos. Se extrajeron las muestras con un volumen cuatro veces mayor de tampón y se centrifugó hasta obtener el extracto de piruvato.
- Para cada pocillo se preparó un total de 50 μl de *Reaction Mix*, que contenía los siguientes componentes: 46 μl de tampón, 2 μl de sonda y 2 μl de mezcla enzimática. Esta cantidad se añadió a cada pocillo con las muestras.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, evitando la luz.
- Se midió a 570 nm en un microplato de lectura.
- El cálculo de la cantidad de piruvato se realizó utilizando la siguiente fórmula:  $C=Py/Sv$  (nmol/μl o mM), donde *Py* era la cantidad de piruvato (nmol) de la muestra en relación con la curva estándar y *Sv* era el volumen de la muestra (μl) añadido en el pocillo.

#### **4.8. ESTUDIO ESTADÍSTICO**

Los datos densitométricos, tanto proteómicos como de los WB, se expresaron en unidades arbitrarias de densitometría (UAD), que son valores relativos de una unidad de medida mostrando el ratio de una determinada cantidad de sustancia, intensidad u otras cantidades respecto a un valor de referencia. El valor de referencia se establece en el laboratorio y sirve como referencia a múltiples medidas realizadas en un entorno

similar. Dado que las UAD expresan el ratio entre una medida y la referencia, son cantidades adimensionales.

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., CA, USA). Para determinar el nivel de significación estadística se utilizó el test de *Mann-Whitney*. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0.05$ .



---

*"El que no sabe lo que busca, no ve lo que encuentra"*

Claude Bernard

## RESULTADOS



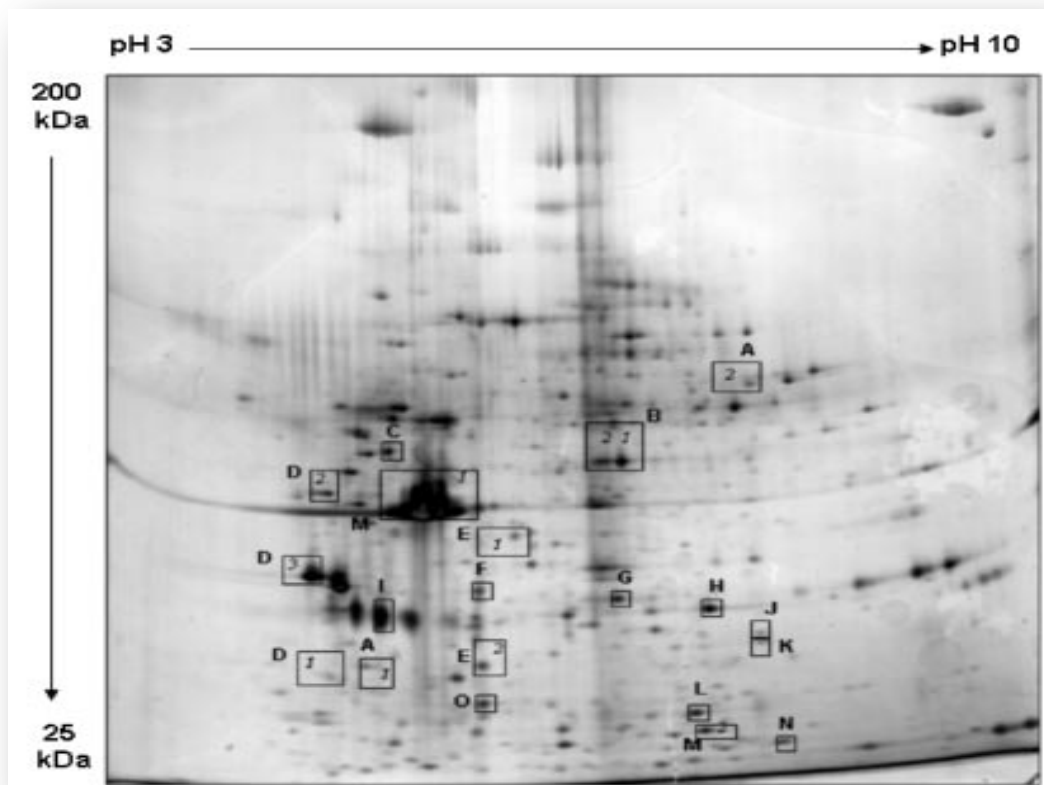
## **5. RESULTADOS**

### **5.1. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL CITOESQUELETO Y SISTEMA CONTRÁCTIL**

Se identificaron las siguientes proteínas asociadas al citoesqueleto y sistema contráctil:

- Glicoproteína 4 asociada a las microfibras
- Actina  $\alpha$  asociada al dominio LIM
- Actina  $\alpha$ , isoformas 1 y 2
- Actina  $\beta$ , isoformas 1 y 2
- Tubulina  $\beta$
- Anexina A2
- Anexina A4
- Anexina A5, isoformas 1 y 2
- Cadena  $\beta$  de la tropomiosina , isoformas 1 y 2
- SM22/transgelina

La Figura 5.1 muestra el mapa proteómico de los segmentos de aorta con las proteínas que se identificaron y se cuantificaron en los experimentos. Los puntos detectados se encontraban en un rango de peso molecular de 15 a 200 kDa y con un pI entre 3 y 10.



**Figura 5.1.** Mapa proteómico tisular. Las proteínas analizadas aparecen recuadradas y las distintas isoformas de cada proteína numeradas. **A:** anexina A5. **B:** aldehído deshidrogenasa mitocondrial. **C:** cadena  $\beta$  ATP sintasa. **D:** cadena  $\beta$  tropomiosina. **E:** actina  $\alpha$  del músculo liso. **F:** tubulina  $\beta$ . **G:** anexina A4. **H:** anexina A2. **I:** glicoproteína 4 asociada a las microfibras. **J:** actina  $\alpha$  asociada a proteínas LIM. **K:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. **L:** fosfoglicerato mutasa. **M:** actina  $\beta$ . **N:** SM22/transgelina. **O:** glutatión S transferasa.

Como se ha indicado en el apartado **4. MATERIAL Y MÉTODO**, cuando se observaron diferencias significativas entre los distintos puntos de los controles y la pared vascular coincubada con PRP, se confirmó la identificación de las proteínas con MS. En la Tabla 5.1 se detallan las masas experimentales y los pI de las proteínas identificadas mediante MS.

**Tabla 5.1.** Masas teóricas, experimentales y puntos isoelectricos.

PROTEÍNA	Nº Acceso base de datos*	Masa teórica (kDa/pI)	Masa experimental (kDa/pI)
<b>Anexina A2</b>	P04272	38.74/6.90	40.1/6.90
<b>Actina <math>\alpha</math> Músculo Liso</b>	P62736	42.38/5.23	41.25/5.70
<b>Actina <math>\alpha</math> Músculo Liso</b>	P62736	42.38/5.23	41.25/5.70
<b>Actina <math>\beta</math></b>	P84336	42.05/5.29	42.00/5.45
<b>Tropomiosina</b>	P58776	32.93/4.60	33.12/4.80
<b>Tropomiosina</b>	P58772	32.71/4.60	32.90/4.80

\* El número de acceso representa el número asignado en la base de datos *Mascot* 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) utilizado como algoritmo para asociar los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas.

Los péptidos asociados a cada proteína en función del número de acceso de la base de datos fueron los que se expresan en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Relación del péptido asociado con la proteína detectada.

PROTEÍNA	PÉPTIDO ASOCIADO
<b>Anexina A2</b>	QDIAFAYQR
<b>Actina <math>\alpha</math></b>	AGFAGDDAPR/GYSFVTTAER/GYSFVTTAER/AVFPSIVGRPR/
<b>Músculo Liso</b>	AVFPSIVGRPR/QEYDEAGPSIVHR/SYELPDGQVITIGNER/ SYELPDGQVITIGNER
<b>Actina <math>\alpha</math></b>	GYSFVTTAER/GYSFVTTAER/AVFPSIVGRPR/AVFPSIVGRPR/
<b>Músculo Liso</b>	QEYDEAGPSIVHR/IWHHSFYNELR/IWHHSFYNELR/SYELPDGQVITIGNER/



	SYELPDGQVITIGNER/DLYANNVLSSGGTTMYPGIADR
<b>Actina <math>\beta</math></b>	AGFAGDDAPR/AVFPSIVGRPR/AVFPSIVGRPR/IWHHTFYNELR/ IWHHTFYNELR/SYELPDGQVITIGNER/SYELPDGQVITIGNER/ VAPEEHPVLLTEAPLNPK/VAPEEHPVLLTEAPLNPK/ DLYANTVLSGGTTMYPGIADR/DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
<b>Tropomiosina</b>	IQLVEEELDR
<b>Tropomiosina</b>	LVIIESDLER/IQLVEEELDR/KLVIIESDLER/RIQLVEEELDR

Los métodos seguidos para la identificación de las proteínas de la pared vascular tras la electroforesis bidimensional se resumen en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Métodos seguidos para identificar las proteínas de la pared vascular.

<b>PROTEÍNA</b>	<b>MÉTODO DE CONFIRMACIÓN</b>	<b>SCORE de la PROTEÍNA</b>	<b>SECUENCIA CUBIERTA (%)</b>
<b>Anexina A2</b>	MS/MS	-	2
<b>Actina <math>\alpha</math> Músculo Liso</b>	MS+MS/MS	111	15
<b>Actina <math>\alpha</math> Músculo Liso</b>	MS+MS/MS	49	21
<b>Actina <math>\beta</math></b>	MS+MS/MS	115	37
<b>Tropomiosina</b>	MS/MS	-	3
<b>Tropomiosina</b>	MS/MS	-	7

MS: espectrometría de masas. MS/MS: espectrometría de masas en tándem.

### 5.1.1. Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta normales

En los segmentos de aorta bovina normales (no estimulados con TNF- $\alpha$ ), la presencia de PRP cambió significativamente la expresión de la actina  $\alpha$  asociada a las proteínas/dominio LIM, la isoforma 2 de la actina  $\alpha$ , la tubulina  $\beta$ , la isoforma 1 de la anexina A5, la isoforma 1 de la cadena  $\beta$  de la tropomiosina y la SM22/transgelina, así como de la isoforma 1 de la actina  $\beta$  y la glicoproteína 4 asociada a las microfibras (Tabla 5.4).

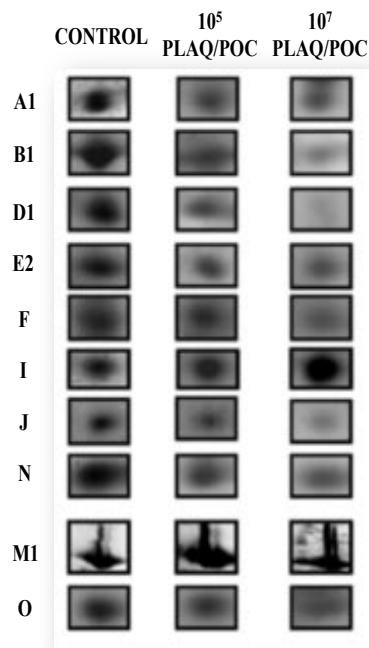
**Tabla 5.4.** Análisis densitométrico de la expresión de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto y sistema contráctil en la aorta bovina normal al coincubarla con PRP.

PARED VASCULAR NORMAL					
PROTEÍNA	CONTROL n=18	10 <sup>5</sup> plaq/poc n=10		10 <sup>7</sup> plaq/poc n=9	
	UAD	UAD	p	UAD	p
<b>Glicoproteína 4 (<math>\mu</math>fibras)</b>	17.1 $\pm$ 2.6	17.3 $\pm$ 2.9	0.109	25.1 $\pm$ 3.0	<b>0.043</b>
<b>Actina <math>\alpha</math> (LIM)</b>	6.0 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 0.6	<b>0.033</b>	1.9 $\pm$ 0.2	<b>0.027</b>
<b>Actina <math>\alpha</math></b>					
<b>Isoforma 1</b>	3.9 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.6	0.225	3.5 $\pm$ 0.4	0.284
<b>Isoforma 2</b>	6.7 $\pm$ 1.3	1.6 $\pm$ 0.2	<b>0.042</b>	2.0 $\pm$ 0.4	<b>0.043</b>
<b>Actina <math>\beta</math></b>					
<b>Isoforma 1</b>	76.0 $\pm$ 11.5	245.9 $\pm$ 40.6	<b>0.050</b>	186.4 $\pm$ 30.6	<b>0.048</b>
<b>Isoforma 2</b>	8.2 $\pm$ 1.5	5.3 $\pm$ 1.2	0.655	3.9 $\pm$ 0.8	0.593
<b>Tubulina <math>\beta</math></b>	8.5 $\pm$ 1.7	3.5 $\pm$ 0.6	0.465	2.9 $\pm$ 0.5	<b>0.048</b>

<b>Anexina</b>					
<b>A2</b>	7.1±1.3	7.5±1.4	0.688	7.3±1.1	0.689
<b>A4</b>	6.5±0.9	4.9±1.2	0.990	4.8±1.1	0.715
<b>A5 (isoforma 1)</b>	8.0±2.0	3.3±0.7	<b>0.045</b>	3.3±0.6	<b>0.043</b>
<b>A5 (isoforma 2)</b>	5.5±1.1	3.1±0.7	0.715	2.3±0.4	0.715
<b>Tropomiosina (cadena β)</b>					
<b>Isoforma 1</b>	10.0±2.0	2.7±0.6	<b>0.019</b>	0.8±0.2	<b>0.009</b>
<b>Isoforma 2</b>	8.6±1.5	6.0±1.1	0.273	4.2±1.0	0.273
<b>SM22/transgelina</b>	11.2±2.7	3.5±0.9	<b>0.048</b>	3.0±0.5	<b>0.045</b>

Unidades arbitrarias de densitometría (UAD). Los resultados se expresan en media ± DE. El número de muestras por cada experimento se muestra en la tabla (n).

Como puede observarse en la Figura 5.2, se produjeron cambios en la expresión de muchas de las proteínas al coincubarlas con las dos concentraciones de plaquetas de los experimentos realizados.



**Figura 5.2.** Proteínas expresadas en la pared de la aorta sana con diferencias significativas al incubarlas con PRP. **A1:** anexina A5. **B1:** aldehído deshidrogenasa mitocondrial. **D1:** cadena β tropomiosina. **E2:** actina α del músculo liso. **F:** tubulina β. **I:** glicoproteína 4 asociada a las microfibras. **J:** actina α asociada a LIM. **M:** actina β. **N:** SM22/transgelina. **O:** glutatión S transferasa.

La mayoría de las proteínas del citoesqueleto y del sistema contráctil de la pared vascular sana experimentaron una disminución en su expresión. Este efecto se observó con la incubación de las dos concentraciones de plaquetas ( $10^5$  y  $10^7$  plaquetas/pocillo) en la actina  $\alpha$ , la actina  $\alpha$  asociada a las proteínas LIM, la anexina A5, la tropomiosina y la SM22/transgelina. Sin embargo, a pesar de observarse una clara disminución, no se alcanzó la significación estadística con la isoforma 2 de la anexina A5 y la isoforma 2 de la cadena  $\beta$  de la tropomiosina. Otras proteínas, como la tubulina  $\beta$ , sólo se infraexpresaron significativamente al coincubar la pared vascular con la concentración más alta de PRP ( $10^7$  plaquetas/pocillo).

Dos proteínas presentaron un aumento en su expresión tras la incubación con PRP. La isoforma 1 de la actina  $\beta$  se sobreexpresó significativamente en las muestras de aorta sana tanto en la incubación con  $10^5$  plaquetas/pocillo como  $10^7$  plaquetas/pocillo. Por el contrario, la isoforma 2 presentó una disminución no significativa con las dos concentraciones de plaquetas. La glicoproteína 4 asociada a las microfibrillas también aumentó significativamente su expresión, aunque sólo al coincubar la pared vascular con  $10^7$  plaquetas/pocillo.

En el Apéndice **A. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO** se encuentra la relación de diagramas de barras que muestran los cambios en la expresión de las proteínas analizadas relacionadas con el citoesqueleto y el sistema contráctil.

### 5.1.2. Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$

En los segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$ , la presencia de PRP cambió de forma significativa la expresión en la pared vascular de un menor número de proteínas del citoesqueleto y del sistema contráctil respecto a la pared vascular sana (Tabla 5.5.).

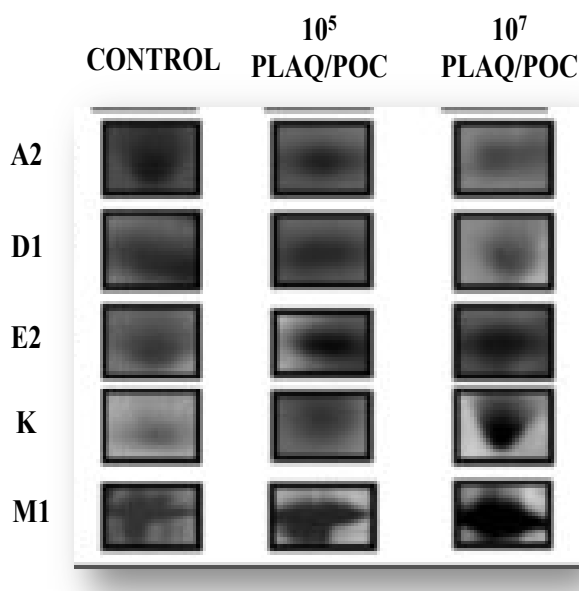
**Tabla 5.5.** Análisis densitométrico de la expresión de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto y sistema contráctil en la aorta bovina preinflamada al coincubarla con PRP.

PARED VASCULAR PREINFLAMADA					
PROTEÍNA	CONTROL n=13	10 <sup>5</sup> plaq/poc n=10		10 <sup>7</sup> plaq/poc n=10	
	UAD	UAD	p	UAD	p
Glicoproteína 4 ( $\mu$ fibras)	11.0 $\pm$ 3.0	17.8 $\pm$ 3.6	0.080	14.5 $\pm$ 5.8	0.180
Actina $\alpha$ (LIM)	3.5 $\pm$ 1.1	2.3 $\pm$ 0.5	0.180	3.3 $\pm$ 0.9	0.180
Actina $\alpha$					
Isoforma 1	3.8 $\pm$ 0.6	5.5 $\pm$ 1.3	0.225	4.5 $\pm$ 1.2	0.465
Isoforma 2	4.2 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 1.4	<b>0.048</b>	7.5 $\pm$ 1.4	<b>0.048</b>
Actina $\beta$					
Isoforma 1	92.5 $\pm$ 34.9	184.6 $\pm$ 73.0	0.068	322.5 $\pm$ 53.8	<b>0.037</b>
Isoforma 2	2.6 $\pm$ 1.0	3.6 $\pm$ 0.8	0.068	3.3 $\pm$ 1.3	0.068
Tubulina $\beta$	7.7 $\pm$ 1.4	8.7 $\pm$ 1.6	0.655	4.0 $\pm$ 1.4	0.109
Anexina					

<b>A2</b>	7.9±1.8	11.8±5.0	0.900	16.8±4.4	0.180
<b>A4</b>	6.5±1.7	6.4±1.3	0.068	10.2±2.9	0.068
<b>A5 (isoforma 1)</b>	3.2±0.6	7.5±2.4	0.144	3.1±0.9	0.273
<b>A5 (isoforma 2)</b>	6.4±1.3	5.1±1.5	0.715	3.2±0.8	<b>0.043</b>
<b>Tropomiosina (cadena β)</b>					
<b>Isoforma 1</b>	5.4±1.1	4.5±1.6	0.465	2.3±0.7	<b>0.045</b>
<b>Isoforma 2</b>	6.3±1.1	6.1±1.8	0.593	6.5±1.5	0.285
<b>SM22/transgelina</b>	2.5±1.0	1.5±0.5	0.068	1.9±0.7	0.109

Unidades arbitrarias de densitometría (UAD). Los resultados se expresan en media±DE. El número de muestras por cada experimento se muestra en la tabla (n).

Así, en los segmentos preincubados con TNF- $\alpha$  se modificó la expresión de las siguientes proteínas: la actina  $\alpha$ , la actina  $\beta$ , anexina A5 y la tropomiosina (Fig. 5.3).



**Figura 5.3.** Proteínas expresadas en la pared de la aorta preinflamada con diferencias significativas al incubarlas con PRP. **A2:** anexina A5. **D1:** cadena  $\beta$  tropomiosina. **E2:** actina  $\alpha$  del músculo liso. **K:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. **M1:** actina  $\beta$ .

La mayoría de las proteínas analizadas presentaron un mayor o menor aumento en su expresión tras la incubación de los segmentos preestimulados con el PRP, aunque en pocos casos este cambio fue significativo. La actina  $\alpha$  se sobreexpresó de forma significativa con las dos concentraciones plaquetarias estudiadas. Sin embargo, el incremento de la isoforma 1 de la actina  $\beta$  sólo se observó al coincubar las muestras con  $10^7$  plaquetas/pocillo.

En la pared vascular preestimulada con TNF- $\alpha$ , sólo se observó una disminución en la expresión de la anexina A5 y de la cadena  $\beta$  de la tropomiosina. Esta infraexpresión fue significativa únicamente tras la coincubación con la mayor concentración de plaquetas ( $10^7$  plaquetas/pocillo) para estas dos proteínas del citoesqueleto.

En el Apéndice A. **NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO** se encuentra la relación de diagramas de barras que muestran los cambios en la expresión de las proteínas analizadas relacionadas con el citoesqueleto y el sistema contráctil.

## **5.2. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO**

Se identificaron las siguientes proteínas en relación con el metabolismo energético en el mapa proteómico de los segmentos de aorta (Fig. 5.1):

- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

- Fosfoglicerato mutasa
- Aldehído deshidrogenasa mitocondrial, isoformas 1 y 2
- Cadena  $\beta$  de la ATP sintasa
- Glutathion S transferasa

En la Tabla 5.6 se detallan las masas teóricas, experimentales y los pI de las proteínas identificadas mediante MS.

**Tabla 5.6.** Masas experimentales y puntos isoeléctricos.

PROTEÍNA	Nº Acceso base de datos*	Masa teórica (kDa/pI)	Masa experimental (kDa/pI)
ATP sintasa (cadena $\beta$ )	Q9MEI6	81.18/9.76	82.00/9.80
Aldehído DH mitocondrial	P12762	54.53/5.70	54.53/5.75

\* El número de acceso representa el número asignado en la base de datos *Mascot* 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) utilizado como algoritmo para asociar los péptidos obtenidos mediante espectrometría de masas. **DH**: deshidrogenasa. **ATP**: adenosín trifosfato.

Los péptidos asociados a cada proteína en función del número de acceso de la base de datos fueron los que se expresan en la Tabla 5.7.

**Tabla 5.7.** Relación del péptido asociado con la proteína detectada.

PROTEÍNA	PÉPTIDO ASOCIADO
ATP sintasa (cadena $\beta$ )	KIYLPLLLPQQ
Aldehído DH mitocondrial	EDVDRAVK/YYAGWADK/TFPTVNPSTGEVICQVAAGDK/ KTFPTVNPSTGEVICQVAAGDK

**DH**: deshidrogenasa. **ATP**: adenosín trifosfato.



Los métodos seguidos para la identificación de las proteínas de la pared vascular tras la electroforesis bidimensional se resumen en la Tabla 5.8.

**Tabla 5.8.** Métodos seguidos para identificar las proteínas de la pared vascular.

PROTEÍNA	MÉTODO DE CONFIRMACIÓN	SCORE de la PROTEÍNA	SECUENCIA CUBIERTA (%)
ATP sintasa (cadena $\beta$ )	MS/MS	-	16
Aldehído DH mitocondrial	MS	34	7

MS: espectrometría de masas. MS/MS: espectrometría de masas en tándem.

### 5.2.1. Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta normales

En los segmentos de aorta sanos (no preestimulados con TNF- $\alpha$ ), se redujo la expresión de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (isoforma 1) y de la glutatión S transferasa (Tabla 5.9).

**Tabla 5.9.** Análisis densitométrico de la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético en aorta bovina normal al coincubarla con PRP.

PARED VASCULAR NORMAL			
PROTEÍNA	CONTROL n=18	10 <sup>5</sup> plaq/poc n=10	10 <sup>7</sup> plaq/poc n=9

	UAD	UAD	p	UAD	p
<b>G3PDH</b>	1.8±0.6	2.1±0.5	0.089	1.2±0.1	0.068
<b>Fosfoglicerato mutasa</b>	6.9±0.8	5.5±1.2	0.999	3.8±0.6	0.138
<b>ADH mitocondrial</b>					
<b>Isoforma I</b>	7.9±1.1	3.7±0.7	<b>0.041</b>	2.3±0.3	<b>0.028</b>
<b>Isoforma II</b>	7.5±1.4	11.2±2.9	0.109	5.5±0.8	0.109
<b>Cadena β ATP sintasa</b>	5.4±0.9	4.6±0.9	0.593	3.6±0.6	0.493
<b>Glutation S transferasa</b>	7.9±1.2	5.4±1.5	0.465	3.8±0.8	<b>0.043</b>

Unidades Arbitrarias de Densitometría (UAD). Los resultados se expresan en media±DE. El número de muestras por cada experimento se muestra en la tabla (n). **G3PDH**: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. **ADH**: aldehído deshidrogenasa. **ATP**: adenosín trifosfato.

La mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo energético de la pared vascular presentaron una disminución de su expresión. Sin embargo, esta disminución únicamente fue significativa para la isoforma 1 de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial con las dos concentraciones plaquetarias y para la glutatión S transferasa solo al coincubar las muestras con la concentración plaquetaria mayor ( $10^7$  plaquetas/pocillo).

En el Apéndice **B. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO** se encuentra la relación de diagramas de barras que muestran los cambios en la expresión de las proteínas analizadas relacionadas con el metabolismo energético.

### 5.2.2. Cambios en la expresión proteica en los segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$

Como se muestra en la Tabla 5.10, la expresión de la mayoría de las proteínas identificadas en la pared vascular preinflamada no se modificó tras la incubación con PRP.

**Tabla 5.10.** Análisis densitométrico de la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético en aorta bovina preinflamada al coincubarla con PRP.

PARED VASCULAR PREINFLAMADA					
PROTEÍNA	CONTROL n=13	10 <sup>5</sup> plaq/poc n=10		10 <sup>7</sup> plaq/poc n=10	
	UAD	UAD	p	UAD	p
<b>G3PDH</b>	2.0±0.7	3.6±0.8	0.080	6.7±1.8	<b>0.043</b>
<b>Fosfoglicerato mutasa</b>	3.6±0.7	4.0±0.8	0.180	2.5±0.5	0.068
<b>ADH mitocondrial</b>					
<b>Isoforma I</b>	7.8±1.8	3.2±0.7	0.109	5.3±1.7	0.593
<b>Isoforma II</b>	5.5±0.6	3.9±0.7	0.180	7.3±2.0	0.109
<b>Cadena <math>\beta</math> ATP sintasa</b>	10.4±2.3	6.1±1.3	0.593	8.1±2.5	0.715
<b>Glutation S transferasa</b>	5.0±2.1	4.0±0.9	0.715	3.7±0.7	0.068

Unidades arbitrarias de densitometría (UAD). Los resultados se expresan en media±DE. El número de muestras por cada experimento se muestra en la tabla (n). **G3PDH**: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. **ATP**: adenosín trifosfato. **DH**: deshidrogenasa.

La coincubación de los segmentos preestimulados con  $10^7$  plaquetas/pocillo produjo una sobreexpresión significativa de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. El nivel de expresión del resto de enzimas identificadas no se modificó tras la incubación con PRP.

En el Apéndice **B. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO** se encuentra la relación de diagramas de barras que muestran los cambios en la expresión de las proteínas analizadas relacionadas con el metabolismo energético.

### 5.2.3. Cambios en la expresión proteica mediante *western blot*

Para tener un conocimiento más profundo de los efectos del PRP en la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, se determinó mediante la técnica WB la expresión total de la triosa fosfato isomerasa y la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, dos enzimas clave en glucolisis, y la cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa (proteína asociada con la fosforilación oxidativa).

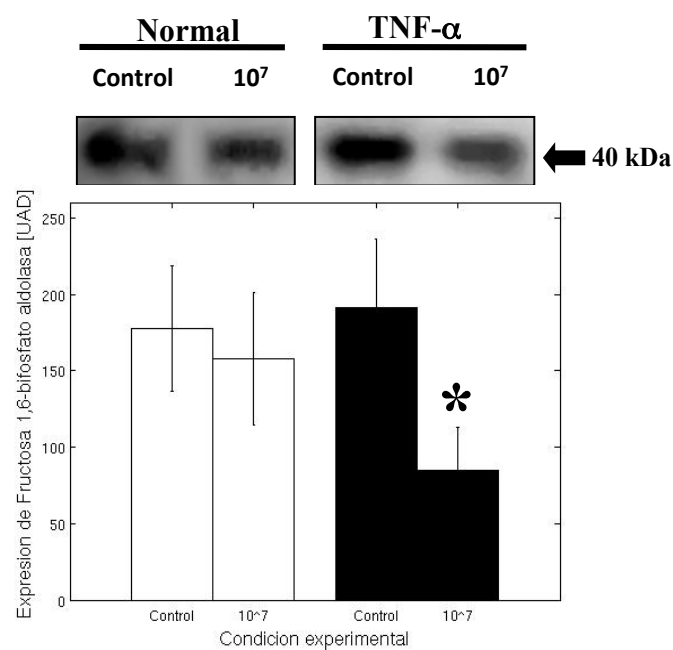
En los segmentos de aorta sana el PRP no modificó la expresión proteica de ninguna de las enzimas estudiadas. En la Tabla 5.11 se muestran los valores medios  $\pm$  DE de las tres enzimas estudiadas mediante WB.

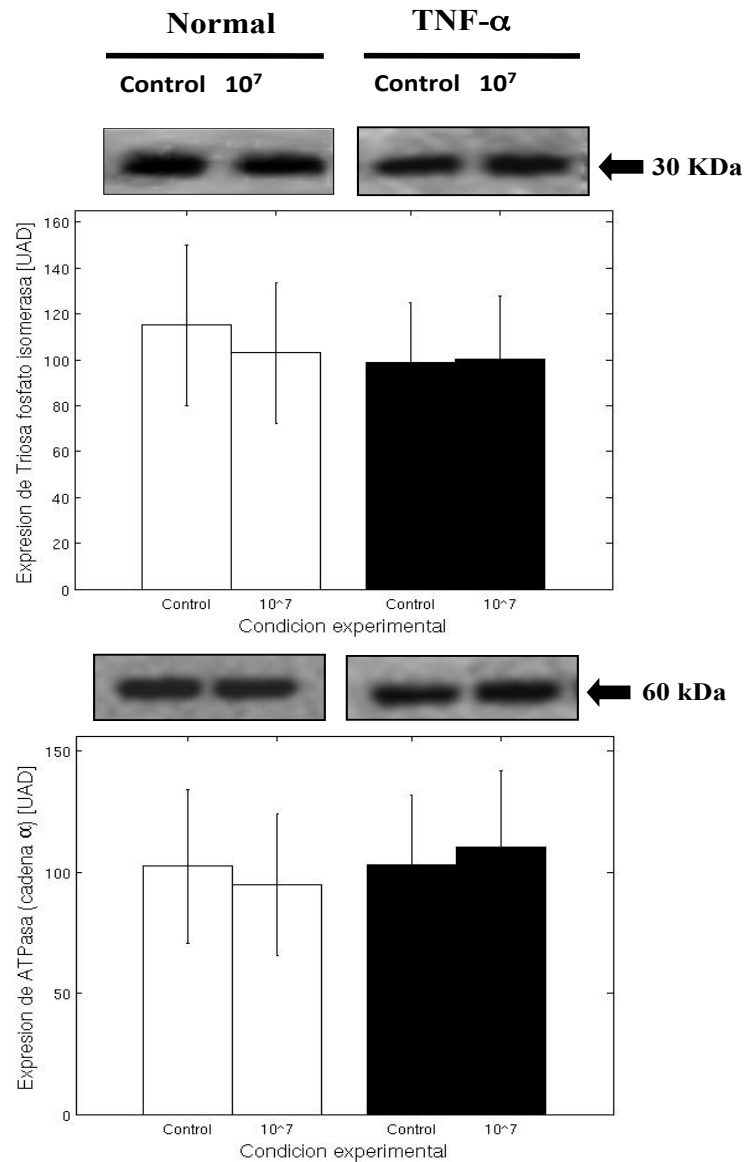
**Tabla 5.11.** Modificaciones en la expresión de las enzimas ATP sintasa (cadena  $\alpha$ ), fructosa 1,6-bifosfato aldolasa y triosa fosfato isomerasa mediante WB.

PROTEÍNA	Normal			Preinflamada		
	Control	10 <sup>7</sup>	p	Control	10 <sup>7</sup>	p
ATPasa (cadena $\alpha$ )	102.4±31,7	94.8±29,3	0.695	103.2±28.7	110±31.7	0.712
F 1,6-bifosfato A	177.7±41.3	158.1±43.4	0.167	191.4±45.3	85.1±27.8	<b>0.021</b>
TPI	115.1±35.1	103.0±30.7	0.743	98.7±26.4	100.3±27.3	0.825

Los resultados se expresan en media±DE. **F 1,6-bifosfato A**: fructosa 1,6-bifosfato aldolasa. **TPI**: triosa fosfato isomerasa.

Sin embargo, en los segmentos de aorta bovina sometidos previamente a una situación inflamatoria la expresión de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa disminuyó tras la incubación con las plaquetas. La presencia del PRP no modificó la expresión proteica de la triosa fosfato isomerasa ni de la cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa en los segmentos de aorta preincubados con TNF- $\alpha$  (Fig. 5.4).



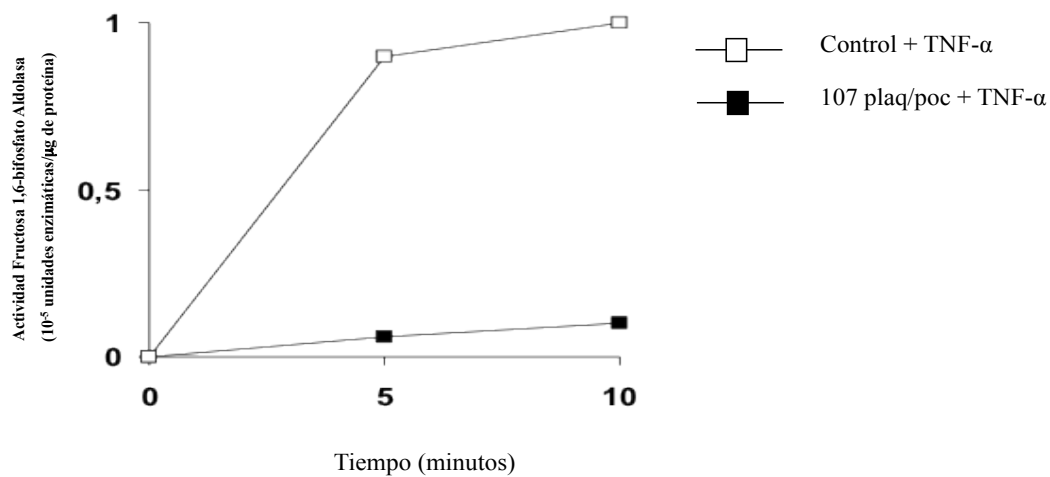


**Figura 5.4.** Representación del *western blot* y diagramas de barras mostrando los efectos de las plaquetas humanas ( $10^7$  plaquetas/pocillo) y valores controles en la expresión de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa, triosa fosfato isomerasa y cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa en las muestras de aorta normal (barra blanca) y preincubadas con 10  $\mu$ g/ml de TNF- $\alpha$  (barra negra). \* :  $p=0.021$

### 5.3. DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

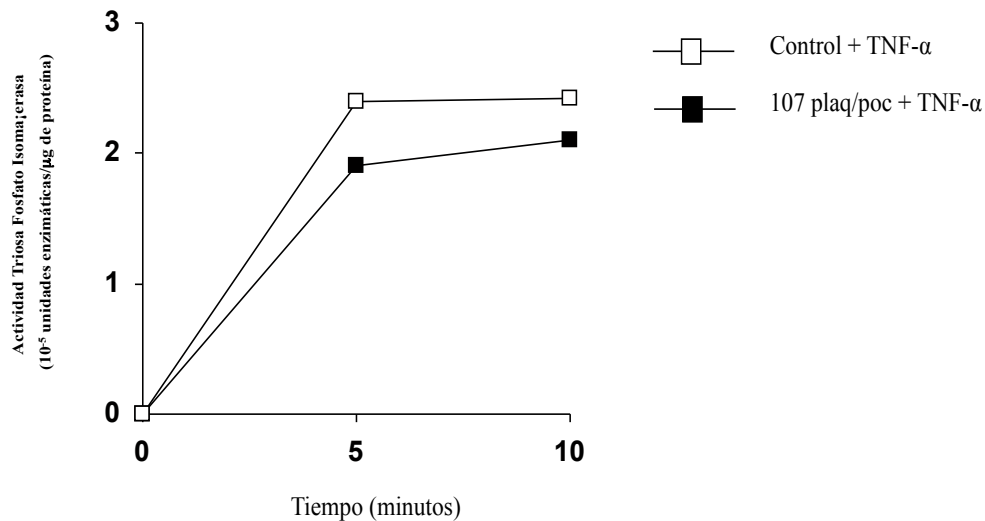
Se determinó la actividad de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa y de la triosa fosfato isomerasa en los segmentos de aorta bovina preincubados con TNF- $\alpha$ .

La presencia de  $10^7$  plaquetas/pocillo disminuyó significativamente la actividad de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (Fig. 5.5). Los valores medios fueron de  $1.00 \cdot 10^{-5} \pm 0.420$  unidades enzimáticas/ $\mu\text{g}$  en el grupo control preinflamado versus  $0.100 \cdot 10^{-5} \pm 0.039$  unidades enzimáticas/ $\mu\text{g}$  en el grupo coincubado con  $10^7$  plaquetas/pocillo ( $p=0.017$ ).



**Figura 5.5.** Gráfica que muestra la actividad de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa en la pared aórtica preinflamada. La actividad fue determinada durante 10 minutos. Los resultados se representan como  $10^{-5}$  unidades enzimáticas/ $\mu\text{g}$  de proteína aórtica.

Sin embargo, no se observó modificación de la actividad de la triosa fosfato isomerasa (Fig. 5.6). Los valores medios fueron de  $2.42 \cdot 10^{-5} \pm 0.91$  unidades enzimáticas/ $\mu\text{g}$  en el grupo control preinflamado versus  $2.10 \cdot 10^{-5} \pm 0.93$  unidades enzimáticas/ $\mu\text{g}$  en el grupo coincubado con  $10^7$  plaquetas/pocillo ( $p=0.848$ ).



**Figura 5.6.** Gráfica que muestra la actividad de la triosa fosfato isomerasa en la pared aórtica preinflamada. La actividad fue determinada durante 10 minutos. Los resultados se representan como  $10^{-5}$  unidades enzimáticas/ $\mu\text{g}$  de proteína aórtica.

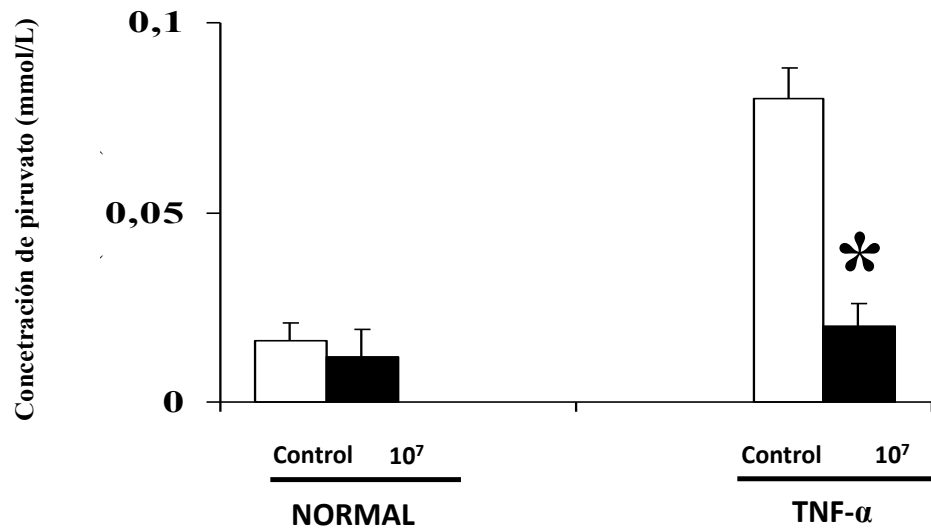
#### 5.4. DETERMINACIONES DEL CONTENIDO DE PIRUVATO

Se determinó la cantidad de piruvato contenido en los segmentos de aorta.

##### 5.4.1. Contenido de piruvato en los segmentos de aorta sana

En los segmentos sanos de aorta el contenido de piruvato no se modificó por la presencia de  $10^7$  plaquetas/pocillo (Fig. 5.7). Los valores medios fueron de  $0.016 \pm 0.005$  mmol/L en el grupo control versus  $0.012 \pm 0.007$  mmol/l en el grupo coincubado con  $10^7$  plaquetas/pocillo ( $p=0.317$ ).





**Figura 5.7.** Barras de error mostrando el efecto de las plaquetas ( $10^7$  plaquetas/pocillo) en el contenido de piruvato en los segmentos de aorta sana y preinflamados con  $10 \mu\text{g/ml}$  de  $\text{TNF-}\alpha$ . Los resultados se expresan en media  $\pm$  desviación estándar. \*  $p=0.024$ .

#### 5.4.2. Contenido de piruvato en los segmentos de aorta preinflamados

Al contrario de lo que ocurría con los segmentos de aorta sanos, los que fueron preincubados con  $\text{TNF-}\alpha$  presentaron una reducción significativa del contenido de piruvato en presencia de  $10^7$  plaquetas/pocillo (Fig. 5.7). Los valores medios fueron de  $0.08 \pm 0.008 \text{ mmol/l}$  en el grupo control estimulado versus  $0.02 \pm 0.006 \text{ mmol/l}$  en el grupo estimulado coincubado con  $10^7$  plaquetas/pocillo ( $p=0.024$ ).

---

*"...ciencia es la opinión verdadera acompañada de razón"*

Platón

## DISCUSIÓN



## 6. DISCUSIÓN

La presente tesis muestra cómo en la pared vascular normal (sana), en presencia de plasma rico en plaquetas, se modifica la expresión de distintas proteínas relacionadas con el citoesqueleto, el sistema contráctil y con el metabolismo energético. Asimismo, cuando la pared vascular es sometida a un estado preinflamatorio, la presencia del plasma rico en plaquetas modifica la expresión de un menor número de proteínas de estos sistemas. En nuestro conocimiento, se establece por primera vez en un sistema *in vitro* el efecto de la plaqueta sobre la expresión proteica relacionada con el citoesqueleto, aparato contráctil y metabolismo energético en la pared vascular.

La interacción entre el endotelio y la plaqueta juega un papel fundamental en los mecanismos de hemostasia e inflamación dentro de la pared vascular<sup>257-259</sup>. Cualquier alteración en la interacción plaqueta/endotelio puede, por tanto, contribuir a una gran variedad de enfermedades, como la arterioesclerosis y las reestenosis y otras enfermedades inflamatorias<sup>259-262</sup>.

Existe un conocimiento extenso de la regulación que ejerce la pared vascular, tanto sana como estimulada, sobre la actividad plaquetaria. En 1998 *Bombeli et al*<sup>153</sup> demostraron la interacción de las plaquetas activadas con células endoteliales de vena umbilical mediada por un mecanismo dependiente de la glicoproteína IIb/IIIa y de los receptores endoteliales ICAM-1, la integrina  $\alpha_v\beta_3$  y la GPIb $\alpha$ . Las consecuencias fisiopatológicas de la activación de las plaquetas en la circulación aún no han sido

totalmente descifradas pero, a pesar de ello, sí está bien establecida la relación entre el incremento de la activación plaquetaria y el aumento del riesgo de complicaciones trombóticas en diferentes enfermedades como la diabetes, la preeclampsia, la angina inestable, la enfermedad vascular periférica y el ictus, así como tras los procedimientos de angioplastia y terapia fibrinolítica<sup>263</sup>. Precisamente por tratarse de plaquetas activadas, y no en estado de reposo, se sugirió que el trombo plaquetario podía también formarse en ausencia de una denudación de las células endoteliales, particularmente en la microcirculación<sup>264-267</sup>. Sin embargo, mientras que los receptores plaquetarios involucrados en la formación del agregado plaquetario y la matriz de adhesión han sido ampliamente estudiados, los mecanismos responsables de la interacción de las plaquetas y del endotelio aún no están del todo aclarados.

Numerosas líneas de investigación indican que las sustancias liberadas por las plaquetas en la proximidad de la pared vascular inducen cambios en los genes de la misma<sup>262</sup>. La expresión génica de la MCP-1 y la ICAM-1 está regulada por factores de transcripción del NF- $\kappa$ B<sup>49,268,269</sup>. A su vez, se ha observado que las plaquetas pueden inducir dicha expresión en leucocitos<sup>270,271</sup>. En este sentido, existen trabajos que han mostrado cómo las plaquetas pueden modificar la expresión de proteínas inflamatorias en la pared vascular. *Gawaz et al*<sup>238</sup> incubaron células endoteliales de vena umbilical humana con plaquetas no estimuladas o estimuladas con ADP durante seis horas y determinaron la secreción de MCP-1 y la expresión en superficie de ICAM-1 mediante ELISA y citometría de flujo, respectivamente. Observaron que las plaquetas activadas modulaban las propiedades quimiotácticas (MCP-1) y de adhesión (ICAM-1) de las CE mediante un mecanismo dependiente de NF- $\kappa$ B, contribuyendo todo ello a un estado inflamatorio precoz relacionado con el proceso de aterogénesis y

reestenosis. *González-Fernández et al*<sup>239</sup> estudiaron el papel de las plaquetas activadas en la modulación de la proteína iNOS durante los dos primeros días después de la denudación *in vivo* del endotelio de arteria carótida de ratas *Wistar*. Los autores demostraron un papel fundamental de las plaquetas en la disminución de la expresión de la proteína iNOS, efecto que podía ser bloqueado con los inhibidores de la GPIIb/IIIa. En todos estos trabajos se ha estudiado el efecto de las plaquetas activadas, y no en reposo.

Como ya se ha demostrado en el pasado, las plaquetas activadas tienen una función primordial en el desarrollo de la arterioesclerosis<sup>262</sup>, pero el conocimiento del efecto que ejercen las plaquetas no activadas como reguladoras de la expresión de proteínas involucradas en otros mecanismos como el citoesqueleto, el sistema contráctil y las relacionadas con el metabolismo energético es escaso. En este sentido, sería interesante conocer si las plaquetas pueden modificar estas proteínas, tanto en la pared vascular sana como en una situación inflamatoria, como ocurre en las enfermedades cardiovasculares.

### **6.1. MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL CITOESQUELETO Y SISTEMA CONTRÁCTIL**

La primera observación derivada de esta tesis fue que en la pared vascular sana, la presencia de PRP disminuyó la expresión de diferentes proteínas relacionadas con el citoesqueleto y el sistema contráctil. Se determinó una modificación significativa en la expresión de la actina  $\alpha$  asociada a las proteínas LIM, la isoforma 2 de la actina  $\alpha$ , la tubulina  $\beta$ , la isoforma 1 de la cadena  $\beta$  de la tropomiosina y la SM22/transgelina.

En concordancia con nuestra observación, *Li et al*<sup>272</sup> demostraron previamente que los factores liberados por las plaquetas, como el factor de crecimiento plaquetario PDGF, podía inhibir la expresión de la actina  $\alpha$  del músculo liso de la pared vascular. En esta misma línea, en 2007 *Je and Sohn*<sup>273</sup> presentaron un estudio con preparados de segmentos de aorta que expusieron a agentes contráctiles, como la adrenalina. Estos autores demostraron que los ratones con deficiencia de la SM22  $\alpha$  presentaban un incremento en la expresión de la SM22  $\beta$ , pero no cambiaba la expresión de la actina, desmina o calponina. Esta ausencia de SM22/transgelina en los ratones disminuía la capacidad contráctil de los vasos, obteniendo así una evidencia inicial sobre el papel de la SM22  $\alpha$  en la regulación de la contractilidad no dependiente del calcio.

Es interesante apuntar que las plaquetas pueden liberar sustancias que producen vasoconstricción en una pared enferma, mientras que pueden promover la vasodilatación en los vasos sanos<sup>274</sup>. El efecto relajante de las plaquetas es mediado por la liberación de nucleótidos adenina, que a su vez induce liberación de un factor relajante derivado del endotelio, mientras que el efecto constrictor es mediado por el tromboxano A2 y la serotonina<sup>274,275</sup>. El estudio de *Houston et al*<sup>275</sup> mostró que las plaquetas humanas provocaban la contracción de arterias coronarias caninas cuyo endotelio había sido denudado por medio de la liberación de serotonina y tromboxano A2. *Moulds et al*<sup>276</sup> alcanzaron conclusiones similares con arterias digitales humanas. *Raymenants et al*<sup>277</sup> evaluaron los efectos del verapamilo y la aspirina, que disminuyen la liberación de TxA2 y serotonina, en la modulación del tono vascular. Como se esperaba, encontraron que en los sujetos controles las plaquetas inducían vasodilatación en las muestras con endotelio intacto y vasoconstricción en las que lo

tenían denudado. El tratamiento con verapamilo incrementó la vasodilatación mediada por las plaquetas en los segmento de aorta con endotelio intacto y abolió la vasoconstricción en las muestras denudadas. Por otra parte, la aspirina también abolió la vasoconstricción mediada por las plaquetas en los segmento arteriales sin endotelio.

El hecho de que el PRP disminuya la expresión de proteínas relacionadas con el sistema contráctil en la pared vascular sana podría estar relacionado con una reducción de la contractilidad vascular por las plaquetas. Por otro lado, la sobreexpresión de otras dos proteínas del sistema contráctil en la pared sana, como son la glicoproteína 4 asociada a las microfibras y la isoforma 1 de la actina  $\beta$ , puede indicar un mecanismo de compensación por la infraexpresión de las otras proteínas del sistema contráctil mencionadas con anterioridad.

En los experimentos de esta tesis, cuando se indujo un estado preinflamatorio en la pared vascular, la presencia de PRP también produjo una modulación de la expresión de las proteínas del sistema contráctil pero en menor número que en los segmentos de aorta sanos. Proteínas como la glicoproteína 4 asociada a las microfibras, la tubulina  $\beta$  y la SM22/transgelina fueron infra o sobreexpresadas en la pared sana, no siendo así el los segmentos incubados con TNF- $\alpha$ .

Otras proteínas, como la isoforma 1 de la actina  $\beta$  y la isoforma 1 de la cadena  $\beta$  de la tropomiosina, se modificaron tanto con la incubación con  $10^5$  plaquetas por pocillo como con  $10^7$  plaquetas por pocillo en la pared vascular sana. Sin embargo, solo se modificaron con  $10^7$  plaquetas por pocillo en los segmentos estimulados con TNF- $\alpha$ . Es difícil determinar la importancia de los cambios observados en la



expresión de las proteínas sobre la funcionalidad del endotelio. Sabemos que éste representa un papel muy importante como barrera selectiva para el paso de líquidos y solutos<sup>278</sup>. Las uniones adhesivas entre las CE regulan la permeabilidad del endotelio y muchos estudios han indicado la importante contribución del citoesqueleto de actina para mantener la integridad de la unión<sup>279-283</sup>. Así, *Kurth et al*<sup>284</sup> describieron que la unión de la gelsolina a la actina es un evento específico de activación muy relacionado con los flujos intracelulares de calcio que podría ser fundamental en los procesos de polimerización de los filamentos de actina. La tropomiosina es un componente integral de los filamentos de actina en todas las células eucariotas. Los resultados de esta tesis mostraron que la cadena  $\beta$  de la tropomiosina se modificó tanto con la incubación con  $10^5$  plaquetas por pocillo como con  $10^7$  plaquetas por pocillo en la pared vascular sana. Sin embargo, solo se modificó con  $10^7$  plaquetas por pocillo en los segmentos estimulados con TNF- $\alpha$ .

Tomados en conjunto, estos resultados aparentemente pueden sugerir un efecto dual de las plaquetas a nivel molecular sobre el sistema contráctil, dependiendo de la situación inflamatoria de la pared vascular. Esto estaría en concordancia con la extensa literatura existente sobre la observación de que las plaquetas inducen vasodilatación en las arterias sanas, pero vasoconstricción en las arterias enfermas.

La presencia de PRP disminuyó la expresión de la isoforma 1 de la anexina A5 en la pared vascular sana y con  $10^7$  plaquetas por pocillo se redujo la expresión de la isoforma 2 en los segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$ . La familia de las anexinas intervienen en la organización del citoesqueleto asociado a la membrana y también se han identificado como unas importantes reguladoras del balance

hemostático<sup>285</sup>. A su vez, las CE desempeñan un papel crítico en la hemostasia, proceso por el cual se regula la fluidez y la coagulación de la sangre<sup>234,286</sup>. En condiciones normales, el endotelio constituye una barrera antitrombótica; sin embargo, la ausencia de endotelio conlleva la formación de un trombo intravascular y depósito de fibrina, incluso en ausencia de un estímulo protrombótico<sup>287,288</sup>. La anexina A2 se ha propuesto como un correceptor de las CE para el plasminógeno y el t-PA<sup>289</sup>. *Ling et al*<sup>290</sup> demostraron que los ratones con deficiencia de anexina A2 presentaban depósitos de fibrina y un incompleto aclaramiento del trombo arterial. Estos animales demostraban una lisis normal del coágulo de fibrina, pero la generación de plasmina dependiente del t-PA en la superficie de las CE estaba marcadamente disminuida. Se han descrito numerosas funciones de otras anexinas, especialmente de la anexina A5 en estudios *in vitro*, aunque el papel de esta proteína *in vivo* aún no es del todo conocido. Se ha propuesto como un potencial marcador de apoptosis en las placas de arterioesclerosis<sup>291</sup>. De hecho, se ha encontrado una mayor acumulación de anexina A5 en las placas de ateroma grado IV que en otras lesiones más estables y se ha correlacionado con la severidad de la lesión<sup>292</sup>. De hecho, se ha considerado que la anexina A5 podría ser un marcador de lesiones avanzadas o de placas vulnerables.

## 6.2. MODIFICACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO ENERGÉTICO

El metabolismo de la glucosa parece desempeñar una función determinante en la reactividad vascular. Los pacientes con diabetes mellitus frecuentemente presentan una deficiencia en la vasodilatación endotelio-dependiente en respuesta a

acetilcolina<sup>293,294</sup>, al igual que ocurre en animales de experimentación<sup>295-299</sup>. *Lund et al*<sup>300</sup> demostraron cómo la transferencia genética de eNOS puede mejorar el deterioro de la función vascular en diabéticos. En el presente estudio, se observó un incremento en la expresión de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y, sin embargo, una disminución de la expresión, y por tanto de la actividad, de la fructosa 1,6 bifosfato aldolasa, enzima clave en la fase glicolítica<sup>301</sup>, en los segmentos de aorta preestimulados con TNF- $\alpha$  y coincubados con PRP. Por el contrario, otra enzima clave en la vía glicolítica, la triosa fosfato isomerasa<sup>301</sup>, no cambió su expresión ni su actividad en los segmentos preincubados con TNF- $\alpha$  y coincubados con PRP.

El incremento en la expresión de la G3PDH observado en los segmentos preestimulados con TNF- $\alpha$  podría reflejar un mecanismo compensatorio en la vía glicolítica debido a la reducción en la expresión y actividad de la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa. En este sentido, el contenido de piruvato en la pared vascular, que es el producto final de la vía glicolítica, se encontró reducido en los segmentos preestimulados con TNF- $\alpha$ , sugiriendo una disminución de la actividad de la vía glicolítica.

Hasta hace poco se pensaba que la G3PDH se expresaba continuamente en una cantidad constante en las células. De hecho, la expresión del mRNA de la G3PDH ha sido utilizado frecuentemente como un indicador estándar en los estudios de transcripción genética. Sin embargo, múltiples evidencias demuestran que la G3PDH puede modificar significativamente sus niveles en determinadas circunstancias y posee otras actividades además de la vía glicolítica. Se la ha relacionado con numerosas funciones distintas: como proteína modelo para el análisis

de la estructura proteica y mecanismos enzimáticos, fusión de la membrana, unión de los microtúbulos, actividad fosfotransferasa, exportación del RNA nuclear, replicación del DNA y reparación del mismo<sup>302</sup>. Estas *nuevas* actividades pueden deberse a la localización subcelular y a la estructura oligomérica de la G3PDH *in vivo*. Además, la G3PDH se ha relacionado con las enfermedades neurodegenerativas, cáncer de próstata y patogenia de enfermedades virales<sup>302</sup>. *Ranganna et al*<sup>303</sup> encontraron que la sobreexpresión de la G3PDH se relacionaba con la proliferación de las CML.

En los resultados de esta tesis existió un aumento de la expresión de dicha enzima sólo cuando los segmentos de aorta fueron sometidos a una situación preinflamatoria. Algo bien conocido es que la formación de las placas de arteriosclerosis conlleva diferentes eventos sincronizados como la adhesión, migración, proliferación y transformación celular, y estos eventos son mediados por factores de crecimiento y citoquinas. La proliferación vascular de las CML es un paso clave en enfermedades como la hipertensión<sup>304-306</sup>, arteriosclerosis<sup>305-307</sup> y la restenosis postangioplastia<sup>307-311</sup>. Diferentes estudios han revelado que la expresión de la G3PDH altera su expresión sustancialmente y de forma independiente por algunas actividades celulares<sup>312-317</sup>. Estudios posteriores de *Ranganna et al*<sup>318</sup> evidenciaron un aumento de la expresión de la G3PDH por el factor de crecimiento plaquetario BB. Las CML presentaron de 2.5 a 3.9 veces más cantidad de mRNA de la G3PDH y un incremento de 2.5 a 3.0 veces en la actividad catalítica de esta enzima después de 20-24 horas de tratamiento con PDGF-BB. Además, cuando la pared vascular está estimulada, como ocurre en los estados inflamatorios, la secreción plaquetaria, incluyendo el factor de crecimiento BB, puede favorecer la sobreexpresión de la

G3PDH. Estas observaciones sugieren una relación entre la proliferación de las CML, la demanda energética celular y la expresión de la G3PDH, basándose en que la proliferación celular es un proceso demandante de energía a causa de un aumento en el metabolismo y requiere una generación de energía que parece proporcionarse por la sobreexpresión de la G3PDH. Se ha observado una relación similar entre la proliferación celular, la demanda de energía y la expresión de la G3PDH en células normales, cancerosas y transformadas<sup>312-314,319-323</sup>.

La enzima aldehído deshidrogenasa mitocondrial (ADH<sub>m</sub>) es la responsable de la oxidación de los aldehídos a ácidos carboxílicos. Esta enzima posee una actividad reductasa<sup>324</sup> que cataliza específicamente la formación de 1,2-glicerol dinitrato y nitritos a partir de la nitroglicerina en la mitocondria<sup>324,325</sup>, produciendo una vasodilatación dependiente de GMP cíclico. *Zhang et al*<sup>326</sup> evidenciaron que la inhibición de la ADH<sub>m</sub> atenuaba la respuesta hemodinámica a la nitroglicerina, tanto sistémica como del lecho coronario, y acortaba la duración de su acción. Del mismo modo, múltiples estudios han mostrado que la glutatión S transferasa potencia la inhibición plaquetaria mediante la nitroglicerina, sugiriendo que esta enzima pueda estar involucrada en la transformación de la nitroglicerina en NO<sup>327</sup>. En los experimentos de coincubación, las plaquetas indujeron una reducción de la expresión de ambas, la ADH<sub>m</sub> (isoforma 1) y de la glutatión S transferasa en la pared vascular sana, lo que sugiere que las plaquetas podrían modular la respuesta vasodilatadora a los nitrovasodilatadores. *Miller et al*<sup>328</sup> demostraron el papel de las plaquetas en la respuesta constrictora de las arterias coronarias *in vivo* a la acetilcolina tras un daño endotelial. Este efecto podía ser inhibido al bloquear la función plaquetaria, lo que sugiere que las plaquetas participan en la vasoconstricción inducida por la

acetilcolina. Sin embargo, hasta donde alcanza nuestro conocimiento no existen publicaciones sobre el posible efecto de las plaquetas en la respuesta vasodilatadora mediada por nitratos.

Una función importante de la glutatión S transferasa es su efecto protector en la degradación de las membranas biológicas por la reducción no específica de fosfolípidos peroxidados mediada por el glutatión. La hipertensión arterial es una entidad asociada con el estrés oxidativo y, por tanto, con una producción incrementada de radicales libres de oxígeno<sup>329-332</sup>. De hecho, la inducción de un estado de estrés oxidativo mediante la deplección del glutatión causa hipertensión severa mantenida<sup>333</sup>. *Vaziri et al*<sup>334</sup> demostraron en ratas con hipertensión inducida cómo el estrés oxidativo estaba asociado a una sobreexpresión de las enzimas generadoras de superóxido, la NADPH oxidasa, sin evidencia de deficiencia de la glutatión peroxidasa, catalasa o dismutasa. La alteración de los sistemas antioxidantes, como ocurre en la insuficiencia renal crónica, culminan en un estrés oxidativo que puede contribuir al desarrollo de una arterioesclerosis acelerada y otras complicaciones a largo plazo. *Ceballos-Picot et al*<sup>335</sup> encontraron una importante disminución de la actividad de la glutatión S transferasa en los pacientes con insuficiencia renal crónica. Esta alteración en los sistemas antioxidantes incrementaba gradualmente con el grado de enfermedad renal. La reducción de la expresión de la glutatión S transferasa en la pared vascular sana puede estar asociada a una disminución de las defensas del vaso contra los agentes oxidantes. Así, las plaquetas por sí mismas podrían intentar promover su activación en contra de las propiedades antitrombóticas de la pared vascular normal.

En resumen, el principal hallazgo de esta tesis fue que en la pared vascular normal las plaquetas pueden modificar la expresión de proteínas asociadas con el sistema contráctil y con el metabolismo energético por sí mismas. Sin embargo, bajo una situación inflamatoria las plaquetas cambian la expresión de un menor número de proteínas asociadas con estos dos sistemas previamente mencionados. Por tanto, los resultados proporcionan nuevas evidencias sobre la implicación principal de las plaquetas en la regulación de la expresión de proteínas en la pared vascular, particularmente en condiciones de ausencia de enfermedad y de inflamación, teniendo un importante papel en los procesos isquémicos.

### **6.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

Una limitación de los experimentos de esta tesis podría ser la heterogeneidad interespecie al incubar las plaquetas humanas con los segmentos de aorta bovina. Las plaquetas de origen bovino no pudieron utilizarse, ya que las muestras de sangre para obtener el PRP deben ser inmediatamente aisladas para minimizar la activación plaquetaria. La distancia entre el matadero y el laboratorio de investigación hizo imposible la utilización de las plaquetas de origen bovino. Sin embargo, es importante destacar que la presencia de plaquetas no modificó la expresión de otras proteínas en la pared vascular bovina, lo que apoya la especificidad de los cambios observados.

En condiciones fisiopatológicas las plaquetas pueden interaccionar físicamente con la pared vascular. Sin embargo, en nuestro diseño experimental, las plaquetas y la pared vascular fueron separadas por una membrana, sólo pudiendo interaccionar a través de las sustancias liberadas por cada uno de ellos. La cuestión que surge es

cómo las plaquetas no activadas pueden regular la expresión de proteínas en la pared vascular. Una explicación sobre esto podría ser que las plaquetas no activadas pueden liberar una serie de factores vasoactivos que probablemente pueden afectar a la síntesis de proteínas en la pared vascular e, incluso, en otras células sanguíneas<sup>336</sup>. *Zhou et al*<sup>337</sup> cuantificaron la liberación de NO en plaquetas en estado de reposo y plaquetas activadas con colágeno. Obtuvieron que ambos grupos liberaban NO, siendo esta liberación lineal con respecto al tiempo en las plaquetas no activadas. Estos autores concluyeron que considerando la cantidad de NO derivada de las plaquetas en comparación con la liberada por el endotelio sugiere que éstas tienen un papel fundamental en el mantenimiento del tono vascular y el flujo sanguíneo. Por otra parte, *Raiden et al*<sup>338</sup> estudiaron los mecanismos por los cuales las plaquetas contribuyen a la acumulación selectiva de eosinófilos en los sitios de inflamación alérgica en virtud de su capacidad de producir factor quimiotáctico de neutrófilos. Los autores comprobaron por primera vez el efecto antiapoptótico de las plaquetas, aumentando, por tanto, la supervivencia de los eosinófilos. Demostraron que este efecto antiapoptótico dependía de la liberación de productos solubles de origen plaquetario que eran neutralizados de forma significativa por anticuerpos dirigidos contra el GM-CSF. Estudios realizados mediante citometría de flujo dirigidos a analizar el origen celular de esta citoquina, mostraron la existencia de GM-CSF intracitoplásmico en las plaquetas en estado de reposo.

Otra limitación del estudio, como ocurre en todos los experimentos en los que se utiliza PRP, es que durante la centrifugación para la obtención del PRP existe la posibilidad de un cierto grado de activación plaquetaria, lo cual podría favorecer la liberación de diferentes factores de origen plaquetario. Es por esto por lo que en los



experimentos se utiliza el PRP en lugar de plaquetas aisladas. La utilización de PRP es más fisiológica debido a que la utilización de plaquetas aisladas requiere centrifugados adicionales y, por tanto, se incrementa la posibilidad de activación espontánea de las mismas.

También es plausible que algunos de los cambios observados en el experimento fueran atribuidos a las plaquetas y pudieran ser influidos por el plasma contenido en el PRP. Sin embargo, no podemos descartar el efecto de las plaquetas contenidas en ese plasma. De cualquier manera, los experimentos control se realizaron con la misma cantidad de PRP que el volumen final de PRP + PPP contenido en los pocillos con  $10^5$  plaquetas, habiendo una mayor cantidad de plasma en estos experimentos que en los que contenían  $10^7$  plaquetas por pocillo. Este hecho minimiza el posible efecto del plasma en los cambios proteicos observados.

---

## CONCLUSIONES



## 7. CONCLUSIONES

1. La incubación de segmentos de aorta sana con plasma rico en plaquetas produce una disminución significativa de la expresión de diferentes proteínas del citoesqueleto y sistema contráctil celular, como son la actina  $\alpha$  asociada al dominio LIM, la actina  $\alpha$ , la tubulina  $\beta$ , la anexina A5, la cadena  $\beta$  de la tropomiosina y la SM22/transgelina.
2. Sin embargo, la incubación de segmentos de aorta sana con plasma rico en plaquetas produce un aumento significativo de la expresión de otras, como la actina  $\beta$  y la glicoproteína 4 asociada a las microfibras, posiblemente como mecanismo compensatorio.
3. El efecto sobre el citoesqueleto de la pared vascular observado con las plaquetas es menor en la pared vascular preinflamada que en la pared vascular sana.
4. La incubación de segmentos de aorta sana con plasma rico en plaquetas produce una disminución significativa de la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo energético. Sin embargo, cuando los segmentos de aorta están preinflamados no se producen cambios significativos en la expresión proteica.

5. En la arteria sometida a una situación preinflamatoria e incubada con plaquetas, el cambio más significativo observado con respecto al metabolismo energético es la reducción de la expresión y actividad de la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa y la ausencia de modificaciones en la triosa fosfato isomerasa, dos enzimas clave en el metabolismo de la glucosa, acompañadas de una reducción del contenido de piruvato.
  
6. Los resultados sobre la reducción de piruvato en la pared vascular preinflamada coincubada con plasma rico en plaquetas sugieren que en estas condiciones hay una reducción de la glucólisis.

---

## BIBLIOGRAFÍA



1. Clark JM, Glagov S. *Luminal surface of distended arteries by scanning electron microscopy: eliminating configurational and technical artefacts*. Br J Exp Pathol 1976;**57**:129-35.
2. Levy B, Tedgui A (ed). *Biology of the arterial Wall*. Norwell, MA: Kluwer Academic; 1999.
3. Smith ML, Long DS, Damiano ER, Ley K. *Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo*. Biophys J 2003;**85**:637-45.
4. Kramer RH, Bensch KG, Davison PM, Karasek MA. *Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells*. J Cell Biol 1984;**99**:692-98.
5. Wight TN. *Cell biology of arterial proteoglycans*. Arteriosclerosis 1989;**9**:1-20.
6. Sidawy A, Sumpio B, DePalma R (ed). *The basic science of vascular disease*. Armonk, NY: Futura; 1997.
7. Dobrin PB. *Distribution of lamellar deformations: implications for properties of the arterial media*. Hypertension 1999;**33**:806-10.
8. Pollard TD, Borisy GG. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell 2003;**112**:453-65.
9. Srere PA. *Macromolecular interactions: tracing the roots*. Trends Biochem Sci 2000;**25**:150-3.
10. Prasain N, Stevens T. *The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes*. Microvasc Res 2009;**77**:53-63.



11. Gunning PW, Schevzov G, Kee AJ, Hardeman EC. *Tropomyosin isoforms: dividing rods for actin cytoskeleton function*. Trends Cell Biol 2005;**15**:333-41.
12. Bryce NS, Schevzov G, Ferguson V, Percival JM, Lin JJ, Matsumura F et al. *Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms*. Mol Biol Cell 2003;**14**:1002-16.
13. Walker ML, Burgess SA, Sellers JR, Wang F, Hammer JA 3rd, Trinick J et al. *Two-headed binding of a processive myosin to F-actin*. Nature 2000;**405**:804-7.
14. Dawid IB, Breen JJ, Toyama R. *LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions*. Trends Genet 1998;**14**:156-62.
15. Khurana T, Khurana B, Noegel AA. *LIM proteins: association with the actin cytoskeleton*. Protoplasma 2002;**219**:1-12.
16. Rescher U, Gerke V. *Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions*. J Cell Sci 2004;**117**:2631-9.
17. Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Hostettler A, Rescher U, Draeger A. *Annexins as intracellular calcium sensors*. Cell Calcium 2007;**41**:207-19.
18. Filipenko NR, MacLeod TJ, Yoon CS, Waisman DM. *Annexin A2 is a novel RNA binding protein*. J Biol Chem 2004;**279**:8723-31.
19. Banderowicz-Pikula J (ed). *Annexins: biological importance and annexin-related pathologies*. New York, NY:Kluwer Academic Publishers; 2003.
20. Romisch J, Schöler E, Bastian B, Bürger T, Dunkel FG, Schwinn A et al. *Annexins I to VI: quantitative determination in different human cell types and in plasma after myocardial infarction*. Blood Coagul Fibrinolysis 1992;**3**:11-7.

21. Carey F, Forder R, Edge MD, Greene AR, Horan MA, Strijbos PJ et al. *Lipocortin 1 fragment modifies pyrogenic actions of cytokines in rats*. Am J Physiol 1990;**259**:R266-9.
22. Kim J, Hajjar KA. *Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor*. Front Biosci 2002;**7**:D341-8.
23. Assinder SJ, Stanton JA, Prasad PD. *Transgelin: an actin-binding protein and tumor suppressor*. Int J Biochem Cell Biol 2009;**41**:482-6.
24. Cucina A, Sterpetti AV, Pupelis G, Fragale A, Lepidi S, Cavallaro A et al. *Shear stress induces changes in the morphology and cytoskeleton organisation of arterial endothelial cells*. Eur J Vasc Endovasc Surg 1995;**9**:86-92.
25. Mullin JM, Laughlin KV, Marano CW, Russo LM, Soler AP. *Modulation of tumor necrosis factor-induced increase in renal (LLC-PK1) transepithelial permeability*. Am J Physiol 1992;**263**:915-24.
26. Marano CW, Lewis SA, Garulacan LA, Soler AP, Mullin JM. *Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line*. J Membr Biol 1998;**161**:263-74.
27. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. *Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis*. FASEB J 2000;**14**:1749-53.
28. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM et al. *Proninflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms*. J Immunol 2003;**171**:6164-72.

29. Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M et al. *Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma*. J Cell Sci 2000;**113**:2085-90.
30. Nelson D, Cox M (ed). *Principles of Biochemistry. Glycolysis, gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway*. Lehninger. W.H.Freeman; 2004.
31. Wang T, Chen Z, Wang X, Shyy JY, Zhu Y. *Cholesterol loading increases the translocation of ATP synthase beta chain into membrane caveolae in vascular endothelial cells*. Biochim Biophys Acta 2006;**1761**:1182-90.
32. Helmlinger G, Geiger RV, Schreck S, Nerem RM. *Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology*. J Biochem Eng 1991;**113**:123-31.
33. Sato M, Ohshima N. *Flow-induced changes in shape and cytoskeletal structure of vascular endothelial cells*. Biorheology 1994;**31**:143-53.
34. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. *Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor*. Am J Physiol 1986;**250**:H822-7.
35. Beckman JS, Koppenol WH. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol 1996;**271**:C1424-37.
36. Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. *Endothelium and atherosclerosis*. J Hypertens Suppl 1992;**10**:S43-50.
37. Badimón L, Martínez-González J. *Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos*. Rev Esp Cardiol 2002;**55**:S17-26.
38. Badimón L. *Estatinas y función endotelial*. Rev Esp Cardiol 2003;**3**:C25-40.
39. Badimón L, Martínez-González J. *Disfunción endotelial*. Rev Esp Cardiol 2006;**6**:21-30.

40. Nordestgaard B, Nielsen L. *Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins*. Curr Opin Lipidol 1994;**5**:252-7.
41. Zhao B, Ehringer WD, Dierichs R, Miller FN. *Oxidized low-density lipoprotein increases endothelial intracellular calcium and alters cytoskeletal f-actin distribution*. Eur J Clin Invest 1997;**27**:48-54.
42. Badimón L, Martínez-González J. *Bases moleculares y genéticas de las cardiopatías*. Bayés de Luna A, López Sendon JL, Attie F, Alegría Ezquerro E, editores. Cardiología clínica. Barcelona: Editorial Masson, S.A.;22003.p.30-44.
43. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science 1991;**251**:788-91.
44. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD et al. *Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression*. Circ Res 1997;**80**:810-8.
45. Libby P. *Inflammation in atherosclerosis*. Nature 2002;**420**:868-74.
46. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leucocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium*. Arterioscler Thromb 1993;**13**:197-204.
47. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI. *Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and sites predisposed to lesion formation*. Circ Res 1999;**85**:199-207.
48. Farmer JA, Torre-Amione G. *Atherosclerosis and inflammation*. Curr Atheroscler Rep 2002;**4**:92-8.

49. Collins T. *Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion*. Lab Invest 1993;**68**:499-508.
50. Hajjar DP, Haberland ME. *Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and celular saboteurs*. J Biol Chem 1997;**272**:22975-8.
51. Collins T, Cybulsky MI. *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* J Clin Invest 2001;**107**:255-64.
52. Thanos D, Maniatis T. *NF-κB: a lesson in family values*. Cell 1995;**80**:529-32.
53. Bourcier T, Sukhova G, Libby P. *The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis*. J Biol Chem 1997;**272**:15817-24.
54. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA et al. *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest 1995;**96**:60-8.
55. Zeiher AM, Drexler H, Wollschläger H, Just H. *Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis*. Circulation 1991;**83**:391-401.
56. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. *Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase*. J Biol Chem 1995;**270**:319-24.
57. Martínez-González J, Raposo B, Rodríguez C, Badimon L. *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation*. Arterioscler Thromb Vascular Biol 2001;**21**:804-9.

58. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. *Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase*. J Clin Invest 1999;**103**:897-905.
59. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N, Brovkovich V, Malinski T, Lüscher TF. *Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis*. Circulation 1998;**97**:2494-8.
60. Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN. *Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology*. J Clin Invest 1997;**99**:1809-13.
61. Gimbrone MA Jr, Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. *Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis*. Ann N Y Acad Sci 1997;**811**:1-10; discussion 10-1.
62. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P et al. *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell 1998;**2**:275-81.
63. Holvoet P, Davey PC, De Keyser D, Doukouré M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML et al. *Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;**26**:1558-65.
64. Ahuja SK, Murphy PM. *The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for*

- the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor.* J Biol Chem 1996;**271**:20545-50.
65. Hoch RC, Schraufstatter IU, Cochrane CG. *In vivo, in vitro, and molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors.* J Lab Clin Med 1996;**128**:134-45.
66. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.* J Clin Invest 1998;**101**:353-63.
67. Haley KJ, Lilly CM, Yang JH, Feng Y, Kennedy SP, Turi TG et al. *Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation.* Circulation 2000;**102**:2185-9.
68. Hansson GK, Holm J, Holm S, Fotev Z, Hedrich HJ, Fingerle J. *T lymphocytes inhibit the vascular response to injury.* Proc Natl Acad Sci 1991;**88**:10530-4.
69. Gordon S. *Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response.* Cell 2002;**111**:927-30.
70. Andersen HO, Holm P, Stender S, Hansen BF, Nordestgaard BG. *Dose-dependent suppression of transplant arteriosclerosis in aorta-allografted, cholesterol-clamped rabbits. Suppression not eliminated by the cholesterol-raising effect of cyclosporine.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;**17**:2515-23.
71. Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D. *Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in*

- atherosclerotic lesions of rabbits and humans. Am J Pathol* 1992;**140**:291-300.
72. Rambaldi A, Young DC, Griffin JD. *Expression of the M-CSF (CSF-1) gene by human monocytes. Blood* 1987;**69**:1409-13.
73. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM et al. *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. Nature* 1990;**344**:254-7.
74. Sieff CA, Niemeyer CM, Mentzer SJ, Faller DV. *Interleukin-1, tumor necrosis factor, and the production of colony-stimulating factors by cultured mesenchymal cells. Blood* 1988;**72**:1316-23.
75. Hallet MM, Praloran V, Vié H, Peyrat MA, Wong G, Witek-Giannotti J et al. *Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) gene expression in human T-lymphocyte clones. Blood* 1991;**77**:780-6.
76. Steinberg D, Witztum JL. *Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? Circulation* 2002;**105**:2107-11.
77. Hansson GK. *Immune mechanisms in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**:1876-90.
78. Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. *Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. Am J Pathol* 1992;**140**:301-16.
79. Libby P, Ridker PM, Maseri A. *Inflammation and atherosclerosis. Circulation* 2002;**105**:1135-43.



80. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW et al. *Atherosclerotic vascular disease conference: Writing group III: pathophysiology*. Circulation 2004;**109**:2617-25.
81. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. *Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes*. Am J Pathol 2001;**158**:879-91.
82. Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. *Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;**97**:7458-63.
83. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G et al. *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature 1998;**391**:591-4.
84. Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. *Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death*. Circulation 1989;**80**:1747-56.
85. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. *The good smooth muscle cells in atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep 2000;**2**:422-9.
86. Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med 1976;**295**:369-77.
87. Ross R, Glomset JA. *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med 1976;**295**:420-5.
88. Tedgui A, Mallat Z. *Apoptosis as a determinant of atherothrombosis*. Thromb Haemost 2001;**86**:420-6.

- 
89. Hoffmann U, Brady TJ, Muller J. *Cardiology patient page. Use of new imaging techniques to screen for coronary artery disease*. Circulation 2003;**108**:e50-3.
90. Demer LL. *A skeleton in the atherosclerosis closet*. Circulation 1995;**92**:2029-32.
91. Demer LL, Tintut Y. *Osteopontin. Between a rock and a hard plaque*. Circ Res 1999;**84**:250-2.
92. Giachelli CM, Liaw L, Murry CE, Schwartz SM, Almeida M. *Osteopontin expression in cardiovascular diseases*. Ann N Y Acad Sci 1995;**760**:109-26.
93. Boström K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. *Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions*. J Clin Invest 1993;**91**:1800-9.
94. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. *Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture*. Circulation 1994;**90**:775-8.
95. Kaartinen M, Penttilä M, Kovanen PT. *Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture*. Circulation 1994;**90**:1669-78.
96. Fuster V, Badimon JJ, Badimon L. *Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression*. Circulation 1992;**86**:III1-11.
97. Badimon JJ, Zaman A, Helft G, Fayad Z, Fuster V. *Acute coronary syndromes: pathophysiology and preventive priorities*. Thromb Haemost 1999;**82**:997-1004.
98. González-Pacheco H. *From thrombin hypothesis to inflammation. Is it reality?* Arch Cardiol Mex 2006;**76**:S233-8.

- 
99. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. *Pathology of the unstable plaque*. Prog Cardiovasc Dis 2002;**44**:349-56.
100. Faggiotto A, Ross R, Harker L. *Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation*. Arteriosclerosis 1984;**4**:323-40.
101. De Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. *Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?* Cardiovasc Res 1999;**41**:443-9.
102. Cai W, Devaux B, Schaper W, Schaper J. *The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions*. Atherosclerosis 1997; **131**:177-86.
103. Kockx MM. *Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;**18**:1519-1522.
104. Mallat Z, Tedgui A. *Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease*. Circ Res 2001;**88**:998-1003.
105. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. *Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity*. Circulation 1999;**99**:348-53.
106. Tedgui A, Mallat Z. *Apoptosis as a determinant of atherothrombosis*. Thromb Haemost 2001;**86**:420-6.
107. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. *Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina*. Circulation 1996;**94**:1239-46.

108. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC et al. *Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease.* J Am Coll Cardiol 1998;**31**:352-8.
109. Fernández-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A et al. *Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture.* J Am Coll Cardiol 1994;**23**:1562-9.
110. Papanicolau DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. *The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease.* Ann Intern Med 1998;**128**:127-37.
111. George JN. *Platelets.* Lancet 2000;**355**:1531-9.
112. Gewirtz AM, P.M (ed). Churchill Living-stone, New-York; 1991.
113. Metcalf D. *Blood. Thrombopoietin-at last.* Nature 1994;**369**:519-20.
114. Monnet E, Sizaret P, Arbeille B, Fauvel-Lafève F. *Different role of platelet glycoprotein GP Ia/IIa in platelet contact and activation induced by type I and III colagens.* Thromb Res 2000;**98**:423-33.
115. Harrison P, Cramer EM. *Platelet alpha-granules.* Blood Rev 1993;**7**:52-62.
116. Blair P, Flaumenhaft R. *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates.* Blood Rev 2009;**23**:177-89.
117. McNicol A, Israels SJ. *Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis.* Thromb Res 1999;**95**:1-18.
118. Mackie J. (ed) *The biology of haemostasis and thrombosis* (Oxford University Press, 1996).

119. Sixma J. (ed) *Interaction of blood platelets with the vessel Wall*. Edinburgh: Chirchill Livingstone; 1994.
120. Siess W. *Molecular mechanisms of platelet activation*. *Physiol Rev* 1989;**69**:58-178.
121. Gachet C, Cazenave JP. *ADP induced blood platelet activation: a review*. *Nouv Rev Fr Hematol* 1991;**33**:347-58.
122. Kunapuli SP, Daniel JL. *P2 receptor subtypes in the cardiovascular system*. *Biochem J* 1998;**336**:513-23.
123. Hechler B, León C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP et al. *The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation*. *Blood* 1998;**92**:152-9.
124. Jin J, Kunapuli P. *Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced aggregation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:8070-4.
125. Shattil SJ, Budzynski A, Scrutton MC. *Epinephrine induces platelet fibrinogen receptor expression, fibrinogen binding, and aggregation in whole blood in the absence of other excitatory agonists*. *Blood* 1989;**73**:150-8.
126. Anfossi G, Trovati M. *Role of catecholamines in platelet function: pathophysiological and clinical significance*. *Eur J Clin Invest* 1996;**26**:353-70.
127. Tangelder GJ, Teirlinck HC, Slaaf DW, Reneman RS. *Distribution of blood platelets flowing in arterioles*. *Am J Physiol* 1985;**248**:H318-23.
128. Ashby B, Daniel JL, Smith JB. *Mechanisms of platelet activation and inhibition*. *Haematol Oncol Clin North Am* 1990;**4**:1-26.

129. Williamson D, Giuliano S, Jackson SP. *Platelet adhesion receptors: novel targets for anti-thrombotic therapy*. Aust N Z J Med 1999;**29**:452-61.
130. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N Engl J Med 1992;**326**:242-50.
131. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM et al. *Inflammatory roles of P-selectin*. J Clin Invest 1993;**92**:559-70.
132. Crovello CS, Furie BC, Furie B. *Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation*. J Biol Chem 1993;**268**:14590-3.
133. Marcus AJ. *Stratton lecture 1989. Thrombosis and inflammation as multicellular processes: pathophysiologic significance of transcellular metabolism*. Blood 1990;**76**:1903-7.
134. Furman MI, Gardner TM, Goldschmidt-Clermont PJ. *Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation*. Thromb Haemost 1993;**70**:229-32.
135. Ross R (ed) *Pathogenesis of atherosclerosis*. W.B. Saunders Co, Philadelphia; 1997.
136. Marcus A (ed). *Multicellular eicosanoid and other metabolic interactions of platelets and other cells*. Lipincott, Philadelphia; 1994.
137. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM et al. *Platelet functions beyond hemostasis*. J Thromb Haemost 2009;**7**:1759-66.
138. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP et al. *Characterization of the proteins released from activated platelets leads*

- to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions.* Blood 2004;**103**:2096-104.
139. Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, López JA, Afshar-Kharghan V. *Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system.* J Exp Med 2005;**201**:871-9.
140. Pepper DS. *Macromolecules released from platelet storage organelles.* Thromb Haemost 1980;**42**:1667-72.
141. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. *Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives.* J Thromb Haemost 2009;**7**:241-6.
142. Tan KT, Watson SP, Lip GY. *The endothelium and platelets in cardiovascular disease: potential targets for therapeutic intervention.* Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents 2004;**2**:169-78.
143. Lusis AJ. *Atherosclerosis.* Nature 2000; **407**:233-41.
144. Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I et al. *A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation.* J Exp Med 2002;**196**:887-96.
145. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S et al. *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E.* Nat Med 2003;**9**:61-7.
146. May AE, Langer H, Seizer P, Bigalke B, Lindemann S, Gawaz M. *Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis.* Semin Thromb Hemost 2007;**33**:123-7.
147. Danese S, Scaldaferri F, Papa A, Pola R, Sans M, Gasbarrini G et al. *Platelets: new players in the mucosal scenario of inflammatory bowel disease.* Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004;**8**:193:8.

148. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. *Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Br J Haematol 2001;**115**:451-9.
149. Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. *Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome*. Intensive Care Med 1997;**23**:379-85.
150. Levi M. *Platelets in sepsis*. Hematology 2005;**10**:129-31.
151. Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, Koh T, Tanaka R, Ozeki Y et al. *Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis*. J Trauma 2001;**50**:801-9.
152. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A et al. *Vitronectrin receptor (alpha(v) beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction*. Circulation 1997;**96**:1809-18.
153. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalph*. J Exp Med 1998;**187**:329-39.
154. Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A et al. *Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice*. Blood 1995;**86**:1106-14.
155. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;**92**:7450-4.



156. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. *Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules*. Blood 1998;**91**:1318-24.
157. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. J Exp Med 1991;**174**:785-90.
158. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P et al. *Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism*. Blood 1994;**84**:4242-8.
159. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C et al. *Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis*. Atherosclerosis 2000;**148**:75-85.
160. Springer TA. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell 1994;**76**:301-14.
161. Gawaz M, Langer H, May AE. *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest 2005;**115**:3378-84.
162. Cummings RD, McEver RP. C-type lectins. Varki A, Cummings ME, Eslo JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hartz GW, Etzler ME, eds. *Essentials of Glycobiology*, 2nd edn. La Jolla, CA: CSH Press;2009:1857-1929.
163. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K et al. *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium*. Circulation 2001;**103**:1772-7.
164. Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ et al. *Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment*

- requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury.* Circulation 2002;**106**:1523-9.
- 165.Lutgens E, Daemen MJ. *CD40-CD40L interactions in atherosclerosis.* Trends Cardiovasc Med 2002;**12**:27-32.
- 166.Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. *CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation.* Circ Res 2003;**92**:1041-8.
- 167.Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. *The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40.* Blood 2001;**98**:1047-54.
- 168.Danese S, de la Mote C, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Flocchi C. *Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification.* J Immunol 2004;**172**:2011-5.
- 169.von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AE et al. *Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium.* Blood 2005;**105**:924-30.
- 170.Aukrust P, Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A et al. *Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes.* Circulation 1999;**100**:614-20.
- 171.Dimmerler S, Zeiher AM. *Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis?* J Mol Med 2004;**82**:671-7.

172. Werner N, Nickenig G. *Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease*. Ann Med 2007;**39**:82-90.
173. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science 1997;**275**:964-7.
174. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H et al. *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. Circ Res 2001;**89**:E1-E7.
175. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P et al. *Aging, progenitor cells exhaustion, and atherosclerosis*. Circulation 2003;**108**:457-63.
176. Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B et al. *Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice*. J Clin Invest 2004;**113**:1258-65.
177. Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P et al. *Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells*. FASEB J 2006;**20**:2559-61.
178. Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zöhlhoefer D et al. *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo*. J Exp Med 2006;**203**:1221-33.
179. Lev EI, Estrov Z, Aboulfatova K, Harris D, Granada JF, Alviar C et al. *Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix*. Thromb Haemost 2006;**96**:498-504.

180. Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M et al. *Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro*. *Circ Res* 2006;**98**:e2-e10.
181. Langer HF, May AE, Vestweber D, de Boer HC, Hatzopoulos AK, Gawaz M. *Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells*. *Semin Thromb Hemost* 2007;**33**:136-43.
182. Hanson SR, Slichter SJ. *Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement*. *Blood* 1985;**66**:1105-9.
183. Gimbrone MA Jr, Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. *Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium*. *Nature* 1969;**222**:33-6.
184. Ho-Tin-Noé B, George T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. *Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage*. *Cancer Res* 2008;**68**:6851-8.
185. George T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, Benarafa C, Remold-O'Donnell E, Zhao BQ et al. *Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia*. *Blood* 2008;**111**:4958-64.
186. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC et al. *From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis*. *Biotechnology* 1996;**14**:61-5.
187. O'Farrell PH. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. *J Biol Chem* 1975;**250**:4007-21.
188. Bauw G, Van Damme J, Puype M, Vandekerckhove J, Gesser B, Ratz GP et al. *Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating*

- protein data bases from two-dimensional gels*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;**86**:7701-5.
- 189.EDMAN P. *A method for the determination of amino acid sequence in peptides*. Arch Biochem 1949;**22**:475.
- 190.Pandey A, Mann M. *Proteomics to study genes and genomes*. Nature 2000;**405**:837-46.
- 191.Anderson L, Seilhamer J. *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. Electrophoresis 1997;**18**:533-7.
- 192.Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol 1999;**19**:1720-30.
- 193.Maithal K. *Proteomics—a new player in the post-genomic era*. Indian J Biochem Biophys 2002; **39**:291-302.
- 194.López Farré A, González Armengol J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C. *Horizontes de la proteómica en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular*. Clin Invest Arterioscl 2008;**20**:164-72.
- 195.Tuszynski GP, Buck CA, Warren L. *A two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) system using sodium dodecyl sulfate-PAGE in the first dimension*. Anal Biochem 1979;**93**:329-38.
- 196.Nakamura K, Okuya Y, Katahira M, Yoshida S, Wada S, Okuno M. *Analysis of tubulin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the first dimension*. J Biochem Biophys Methods 1992;**24**:195-203.
- 197.Rabilloud T, Lelong C. *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial*. J Proteomics 2011;**74**:1829-41.

198. Gordon JA, Jencks WP. *The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins*. Biochemistry 1963;**2**:47-57.
199. Perdew GH, Schaup HW, Selivonchick DP. *The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes*. Anal Biochem 1983;**135**:453-5.
200. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R et al. *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods 1982;**6**:317-39.
201. Bjellqvist B, Pasquali C, Ranvier F, Sanchez JC, Hochstrasser D. *A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale*. Electrophoresis 1993;**14**:1357-65.
202. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. Electrophoresis 1988;**9**:255-62.
203. Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T. *Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view*. Electrophoresis 2006;**27**:1574-83.
204. Rabilloud T. *Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis*. Electrophoresis 1990;**11**:785-94.
205. Chevalier F, Centeno D, Rofidal V, Tauzin M, Martin O, Sommerer N et al. *Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry*. J Proteome Res 2006;**5**:512-20.

206. Guerrero IC, Kleiner O. *Application of mass spectrometry in proteomics*. Biosci Rep 2005;**25**:71-93.
207. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science 1989;**246**:64-71.
208. Karas M, Hillenkamp F. *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem 1988;**60**:2299-301.
209. Aebersold R, Goodlett DR. *Mass spectrometry in proteomics*. Chem Rev 2001;**101**:269-95.
210. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. Annu Rev Biochem 2001;**70**:437-73.
211. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics 2004;**4**:3665-85.
212. Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, Petersen S, Rayner M. *Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union*. Eur Heart J 2006;**27**:1610-9.
213. Mensah GA, Brown DW. *An overview of cardiovascular disease burden in the United States*. Health Aff (Millwood) 2007;**26**:38-48.
214. Bruneel A, Labas V, Mailloux A, Sharma S, Vinh J, Vaubourdol M et al. *Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture*. Proteomics 2003;**3**:714-23.
215. McGregor E, Kempster L, Wait R, Welson SY, Gosling M, Dunn MJ et al. *Identification and mapping of human saphenous vein medial smooth muscle proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*. Proteomics 2001;**1**:1405-14.

216. Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S et al. *The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells*. Proteomics 2005;**5**:585-96.
217. Alvarez-Llamas G, de la Cuesta F, Barderas ME, Darde V, Padial LR, Vivanco F. *Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective*. Expert Rev Proteomics 2008;**5**:679-91.
218. Stastny J, Fosslien E, Robertson AL Jr. *Human aortic intima protein composition during stages of atherogenesis*. Atherosclerosis 1986;**60**:131-9.
219. Jang WG, Kim HS, Park KG, Park YB, Yoon KH, Han SW et al. *Analysis of proteome and transcriptome of tumor necrosis factor alpha stimulated vascular smooth muscle cells with or without alpha lipoic acid*. Proteomics 2004;**4**:3383-93.
220. Zamorano-León JJ, Fernández-Sánchez R, López Farré AJ, Lapuente-Tiana L, Alonso-Orgaz S, Sacristán D et al. *Direct effect of F12511, a systemic inhibitor of Acyl-CoA cholesterol acyltransferase on bovine aortic endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol 2006;**48**:128-134.
221. Molero L, García-Méndez A, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, Macaya C, López-Farré AJ. *Proteomic approach to identify changes in protein expression modified by 17beta-oestradiol in bovine vascular smooth muscle cells*. Clin Sci 2005;**109**:457-63.
222. Soskic V, Görlach M, Poznanovic S, Boehmer FD, Godovac-Zimmermann J. *Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor*. Biochemistry 1999;**38**:1757-64.



223. Cieniewski-Bernard C, Acosta A, Dubois E, Lamblin N, Beseme O, Chwastyniak M et al. *Proteomic analysis in cardiovascular diseases*. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008;**35**:362-6.
224. Balestrieri ML, Giovane A, Mancini FP, Napoli C. *Proteomics and cardiovascular disease: an update*. Curr Med Chem 2008;**15**:555-72.
225. Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath AM, Aponte AM, Makusky AJ et al. *Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver*. Electrophoresis 2000;**21**:2129-37.
226. Steiner S, Gatlin CL, Lennon JJ, McGrath AM, Seonarain MD, Makusky AJ et al. *Cholesterol biosynthesis regulation and protein changes in rat liver following treatment with fluvastatin*. Toxicol Lett 2001;**120**:369-77.
227. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D et al. *Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients*. J Proteome Res 2006;**5**:2301-8.
228. Jorgensen L. *ADP-induced platelet aggregation in the microcirculation of pig myocardium and rabbit kidneys*. J Thromb Haemost 2005;**3**:1119-24.
229. Theilmeier G, Michiels C, Spaepen E, Vreys I, Collen D, Vermynen J et al. *Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone site in response to hypercholesterolemia*. Blood 2002;**99**:4486-93.
230. Ross R. *Atherosclerosis-an inflammatory disease*. N Engl J Med 1999;**340**:115-26.
231. Stormorken H, Sakariassen KS. *Hemostatic risk factors in arterial thrombosis and atherosclerosis: the thrombin-fibrin and platelet-vWF axis*. Thromb Res 1997;**88**:1-25.

232. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F et al. *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin*. Blood 1998;**92**:507-15.
233. Jaffe EA. *Cell biology of endothelial cells*. Hum Pathol 1987;**18**:234-9.
234. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP et al. *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood 1998;**91**:3527-61.
235. Hawiger J. *Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug*. Hum Pathol 1987;**18**:111-22.
236. Catella-Lawson F. *Vascular biology of thrombosis: platelet-vessel wall interactions and aspirin effects*. Neurology 2001;**57**:S5-7.
237. Massberg S, Vogt F, Dickfeld T, Brand K, Page S, Gawaz M. *Activated platelets trigger an inflammatory response and enhance migration of aortic smooth muscle cells*. Thromb Res 2003; **110**:187-94.
238. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H et al. *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells*. Circulation 1998;**98**:1164-71.
239. González-Fernández F, López-Farré A, Rodríguez-Feo JA, Farré J, Guerra J, Fortes J et al. *Expression of inducible nitric oxide synthase after endothelial denudation of the rat carotid artery.: role of platelets*. Circ Res 1998;**83**:1080-87.
240. Paul RJ. *Smooth muscle energetics*. Annu Rev Physiol 1989;**51**:331-49.

241. Barron JT, Kopp SJ, Tow JP, Messer JV. *Effects of altering carbohydrate metabolism on energy status and contractile function of vascular smooth muscle*. Biochim Biophys Acta 1989;**976**:42-52.
242. Zhang C, Paul RJ. *Excitation-contraction coupling and relaxation in porcine carotid arteries are specifically dependent of glucose*. Am J Physiol 1996;**267**:H1996-H2004.
243. Herman IM, Brant AM, Warty VS, Bonaccorso J, Klein EC, Kormos RL et al. *Hemodynamics and the vascular endothelial cytoskeleton*. J Cell Biol 1987;**105**:291-302.
244. Zhao S, Suciu A, Ziegler T, Moore JE Jr, Bürki E, Meister JJ et al. *Synergistic effects of fluid shear stress and cyclic circumferential stretch on vascular endothelial cell morphology and cytoskeleton*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;**15**:1781-6.
245. Landesberg R, Roy M, Glickman RS. *Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation*. J Oral Maxillofac Surg 2000;**58**:297-300.
246. Merhi Y, Guidoin R, Provost P, Leung TK, Lam JY. *Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty*. Am Heart J. 1995;**129**: 445-451.
247. Moore GE, Woods LK. *Culture media for human cells- RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 y GEM 1717*. TCA manual 1977;**3**:503-9.
248. Bain BJ. *Blood cells: A practical guide*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd; 2002.
249. Molero L, Farré J, García-Mendez A, Jiménez Mateos-Caceres P, Carrasco Martín C, Millás I et al. *Endothelin-1 induced proinflammatory markers in the*

- myocardium and leukocytes of guinea-pigs: role of glycoprotein IIb/IIIa receptors*. Cardiovasc Res 2003;**57**:109-18.
250. López-Farré A, Bernabeu F, Gómez-Garre D, Ramon y Cajal S, Braquet P, López-Novoa JM. *Platelet-activating factor antagonists treatment protects against postischemic acute renal failure in rats*. J Pharmacol Exp Ther 1990;**253**:328-33.
251. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem 1985;**150**:76-85.
252. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, Alonso-Orgaz S et al. *Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome*. J Am Coll Cardiol 2004;**44**:1578-1583.
253. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Thérout P, Van de Werf F et al. *Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials*. Lancet 2002;**359**:189-98.
254. Deckelaum Li, SF (ed.). *Tirofiban, a nonpeptido inhibitor of the platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor*. Marcel Decker, New York, 1997.
255. López-Farré A, Rodríguez-Feo JA, García-Colis E, Gomez J, López-Blaya A, Fortes J et al. *Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of the  $\alpha_1$ -receptor blocker doxazosin*. J Hypertens 2002;**20**:463-70.
256. Misset O, Oppendoes FR. *Simultaneous purification of hexokinase, class-I fructose-biphosphate aldolase, triosephosphate isomerase and*

- phosphoglycerate kinase from Trypanosoma brucei*. Eur J Biochem 1984;**144**:475-83.
257. van Ijzendoorn SCD, Heemskerk JWM, Reutlinger-Sperger CPM. *Interactions between endothelial cells and blood platelets*. Endothelium 1995;**3**:81-98.
258. Gimbrone MA Jr (ed.). *Vascular endothelium: nature's blood container. Vascular Endothelium in hemostasis and thrombosis*. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone; 1986:1-21.
259. Hawiger J. *Platelet-vessel wall interactions*. Atheroscler Rev 1990;**21**:165-86.
260. Benzakour A, Kanthou C. *Cellular and molecular events in atherogenesis: basis for pharmacological and gene therapy approaches to restenosis*. Cell Pharmacol 1996;**3**:7-22.
261. Davies MJ. *The contribution of thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis*. Thromb Res 1996;**82**:1-32.
262. Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature 1993;**362**:801-9.
263. Abrams C, Shattil SJ. *Immunological detection of activated platelets in clinical disorders*. Thromb Haemost 1991;**65**:467-73.
264. Czervionke RL, Hoak JC, Fry GL. *Effect of aspirin in thrombin-induced adherence of platelets to cultured cells from the blood vessel wall*. J Clin Invest 1978;**62**:847-56.
265. Fry GL, Czervionke RL, Hoak JC, Smith JB, Haycraft DL. *Platelet adherence to cultured vascular cells: influence of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)*. Blood 1980;**55**:271-5.

266. Kaplan JE, Moon DG, Weston LK, Minnear FL, Del Vecchio PJ, Shepard JM et al. *Platelets adhere to thrombin-treated endothelial cells in vitro*. Am J Physiol 1989;**257**:H423-33.
267. Tloti MA, Moon DG, Weston LK, Kaplan JE. *Effect of 13-hydroxyoctadeca-9,11-dienoic acid (13-HODE) on thrombin induced platelet adherence to endothelial cells in vitro*. Thromb Res 1991;**62**:305-17.
268. Baeuerle PA. *The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits*. Biochim Biophys Acta 1991;**1072**:63-80.
269. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers*. FASEB J 1995;**9**:899-909.
270. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH et al. *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes*. J Clin Invest 1996;**97**:1525-34.
271. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C et al. *Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets*. Circulation 1997;**95**:2387-94.
272. Li X, van Putten V, Zarinetchi F, Nicks ME, Thaler S, Heasley LE et al. *Suppression of smooth-muscle alpha-actin expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells involves Ras and cytosolic phospholipase A2*. Biochem J 1997;**327**:709-16.
273. Je HD, Sohn UD. *SM22alpha is required for agonist-induced regulation of contractility: evidence from SM22alpha knockout mice*. Mol Cells 2007;**23**:175-81.

274. Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. *Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets*. Science 1983;**22**:273-4.
275. Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM. *Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated canine coronary arteries. Role of serotonin, thromboxane A<sub>2</sub>, and adenine nucleotides*. J Clin Invest 1986;**78**:539-44.
276. Moulds RF, Iwanov V, Medcalf RL. *The effects of platelet-derived contractile agents on human digital arteries*. Clin Sci 1984;**66**:443-51.
277. Raymenants E, Yang B, Nicolini F, Behrens P, Lawson D, Mehta JL. *Verapamil and aspirin modulate platelet-mediated vasomotion in arterial segments with intact or disrupted endothelium*. J Am Coll Cardiol 1993;**22**:684-9.
278. Doggett TM, Breslin JW. *Study of the actin cytoskeleton in live endothelial cells expressing GFP-actin*. J Vis Exp 2011;**(57)**. pii 3187. doi: 10.3791/3187.
279. Spindler V, Schlegel N, Waschke J. *Role of GTPases in control of microvascular permeability*. Cardiovasc Res 2010;**87**:243-53.
280. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. *Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability*. Vascul Pharmacol 2002;**39**:187-99.
281. Yuan SY. *Signal transduction pathways in enhanced microvascular permeability*. Microcirculation 2000;**7**:395-403.
282. Birukov KG. *Small GTPases in mechanosensitive regulation of endothelial barrier*. Microvasc Res 2009;**77**:46-52.
283. Duran WN, Sanchez FA, Breslin JW. *Microcirculatory exchange function*. Tuma, R.F., Duran, W.N., and Ley, K. (eds). Handbook of physiology: microcirculation. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, San Diego; 2008: 81-124.

284. Kurth, M (ed.) *Platelets in biology and pathology*. North Holland Publising Co., New York; 1981.
285. Gerke V. Moss SE (ed). *The annexins*. London: Portland Press Ltd. Pp; 1992, 47-59.
286. Hajjar KA, Esmon NL, Marcus AJ, Muller WA (ed). *Vascular function in hemostasis. Williams hematology*. E. Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps, and U Seligsohn, (ed). McGraw-Hill. New York, New York, USA; 2001, 1451-69.
287. Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, Chan JC, Carmeliet P, Collen D et al. *Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice*. J Clin Invest 1998;**102**:1481-8.
288. Enjyoji K, Sèvigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS 2nd et al. *Targeted disruption of CD39/ATP disphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation*. Nat Med 1999;**5**:1010-7.
289. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. *An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II*. J Biol Chem 1994;**269**:21191-7.
290. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL et al. *Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo*. J Clin Invest 2004;**113**:38-48.
291. Kietselaer BL, Hofstra L, Dumont EA, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. *The role of labeled Annexin A5 in imaging of programmed cell death. From animal to clinical imaging*. Q J Nucl Med 2003;**47**:349-61.



292. Zhao Y, Kuge Y, Zhao S, Morita K, Inubushi M, Strauss et al. *Comparison of  $^{99m}\text{Tc}$ -annexin A5 with  $^{18}\text{F}$ -FDG for the detection of atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$  mice.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007; **34**:1747-55.
293. McNally PG, Watt PA, Rimmer T, Buerden AC, Hearshaw JR, Thurston et al. *Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus.* Clin Sci 1994;**87**:31-6.
294. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR et al. *Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia 1992;**35**:771-6.
295. Cohen RA. *Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus.* Circulation 1993;**87**:V67-V76.
296. Pieper GM, Gross GJ. *Oxygen free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta.* Am J Physiol 1988;**255**:H825-33.
297. Kamata K, Miyata N, Kasuya Y. *Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats.* Br J Pharmacol 1989;**97**:614-8.
298. Meraji S, Jayakody L, Senaratne MP, Thomson AB, Kappagoda T. *Endothelium-dependent relaxation in aorta of BB rat.* Diabetes 1987;**36**:978-81.
299. Pieper GM, Siebeneich W, Moore-Hilton G, Roza AM. *Reversal by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in endothelium of the genetic diabetic BB rat.* Diabetologia 1997;**40**:910-5.

300. Lund DD, Faraci FM, Miller FJ Jr, Heistad DD. *Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves relaxation of carotid arteries from diabetic rabbits*. Circulation 2000;**101**:1027-33.
301. Villar-Palasi C, Larner J. *Glycogen metabolism and glycolytic enzymes*. Annu Rev Biochem 1970;**39**:639-72.
302. Sirover MA. *New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Biochim Biophys Acta 1999;**1432**:159-84.
303. Ranganna K, Joshi T, Yatsu FM. *Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995;**15**:2273-83.
304. Owens GK. *Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol 1989;**257**:H1755-65.
305. Schwartz SM, Heimark RR, Majesky MW. *Developmental mechanisms underlying pathology of arteries*. Physiol Rev 1990;**70**:1177-209.
306. Jackson CL, Schwartz SM. *Pharmacology of smooth muscle cell replication*. Hypertension 1992;**20**:713-36.
307. Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis--an update*. N Engl J Med 1986;**314**:488-500.
308. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium*. Lab Invest 1983;**49**:327-33.
309. McBride W, Lange RA, Hillis LD. *Restenosis after successful coronary angioplasty. Pathophysiology and prevention*. N Engl J Med 1988;**318**:1734-7.

310. Johnson DE, Hinohara T, Selmon MR, Braden LJ, Simpson JB. *Primary peripheral arterial stenoses and restenoses excised by transluminal atherectomy: a histopathologic study*. J Am Coll Cardiol 1990;**15**:419-25.
311. Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG et al. *Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with constitutively active form of the retinoblastoma gene product*. Science 1995;**267**:518-22.
312. Matrisian LM, Rautmann G, Magun BE, Breathnach R. *Epidermal growth factor or serum stimulation of rat fibroblasts induces an elevation in mRNA levels for lactate dehydrogenase and other glycolytic enzymes*. Nucleic Acids Res 1985;**13**:711-26.
313. Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, Fujimori K, Ohkubo M, Sawada K et al. *Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers*. Cancer Res 1987;**47**:5616-9.
314. Epner DE, Partin AW, Schalken JA, Isaacs JT, Coffey DS. *Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression with cell motility and metastatic potential of rat prostatic adenocarcinoma*. Cancer Res 1993;**53**:1995-7.
315. Alexander M, Curtis G, Avruch J, Goodman HM. *Insulin regulation of protein biosynthesis in differentiated 3T3 adipocytes*. J Biol Chem 1985;**260**:11978-85.
316. Oka T, Komori N, Kuwahata M, Sassa T, Suzuki I, Okada M et al. *Vitamin B<sub>6</sub> deficiency causes activation of RNA polymerase and general enhancement of gene expression in rat liver*. FEBS Lett 1993;**331**:162-4.

- 317.Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV, Farber HW. *Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia*. J Biol Chem 1994;**269**:24446-53.
- 318.Ranganna K, Yatsu FM. *Inhibition of platelet-derived growth factor BB-induced expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by sodium butyrate in rat vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;**17**:3420-7.
- 319.Knull HR, Walsh JL. *Association of glycolytic enzymes with the cytoskeleton*. Curr Top Cell Regul 1992;**33**:15-30.
- 320.Schek N, Hall BL, Finn OJ. *Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Res 1988;**48**:6354-9.
- 321.Perfetti V, Manenti G, Gragani TA. *Expression of housekeeping genes in Hodgkin's disease lymph nodes*. Leukemia 1991;**5**:1110-2.
- 322.Persons DA, Schek N, Hall BL, Finn OJ. *Increased expression of glycolysis-associated genes in oncogene-transformed and growth-accelerated states*. Mol Carcinog 1989;**2**:88-94.
- 323.Weikirchen R, Siemeister G, Hartl M, Bister K. *Sequence and expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene from quail embryo fibroblasts*. Gene 1993;**128**:269-72.
- 324.Chen Z, Zhang J, Stamler JS. *Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;**99**:8306-8311.
- 325.Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M et al. *Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance*. J Clin Invest 2004;**113**:482-9.

326. Zhang J, Chen Z, Cobb FR, Stamler JS. *Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin-induced vasodilation of coronary and systemic vessels: an intact canine model*. Circulation 2004;**110**:750-5.
327. Kurz MA, Boyer TD, Whalen R, Peterson TE, Harrison DG. *Nitroglycerin metabolism in vascular tissue: role of glutathione S-transferases and relationship between NO and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formation*. Biochem J 1993;**292**:545-50.
328. Miller WL, Lane GE, Carmichael SW, Bove AA. *Indomethacin attenuates the constriction of canine epicardial coronary arteries to acetylcholine in the absence of endothelium: contribution of platelets to vasoconstriction in vivo*. J Am Coll Cardiol 1989;**14**:1794-802.
329. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z, Gonick HC. *Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in lead-induced hypertension: effect of lazaroid therapy*. Kidney Int 1997;**52**:1042-6.
330. Gonick HC, Ding Y, Bondy SC, Ni Z, Vaziri ND. *Lead-induced hypertension: interplay of nitric oxide and reactive oxygen species*. Hypertension 1997;**30**:1487-92.
331. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. *Nitric oxide synthase expression in the course of lead-induced hypertension*. Hypertension 1999;**34**:558-62.
332. Vaziri ND, Ding Y, Ni Z. *Compensatory up-regulation of nitric-oxide synthase isoforms in lead-induced hypertension; reversal by an superoxide dismutase-mimetic drug*. J Pharmacol Exp Ther 2001;**298**:679-85.
333. Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B. *Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes hypertension in normal rats*. Hypertension 2000;**36**:142-6.

334. Vaziri ND, Lin CY, Farmand F, Sindhu RK. *Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and NADPH oxidase in lead-induced hypertension*. Kidney Int 2003;**63**:186-94.
335. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thèvenin M, Jaudon MC et al. *Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure*. Free Radic Biol Med 1996;**21**:845-53.
336. Xu Q, Hu Y, Kleindienst R, Wick G. *Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1*. J Clin Invest 1997;**100**:1089-97.
337. Zhou Q, Hellermann GR, Solomonson LP. *Nitric oxide release from resting human platelets*. Thromb Res 1995;**77**:87-96.
338. Raiden S, Schettini J, Salamone G, Trevani A, Vermeulen M, Gamberale R, Giordano M, Geffner J. 2003. *Human platelets produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and delay eosinophil apoptosis*. Lab Invest 2003;**83**:589–98.





## APÉNDICES





---

# APÉNDICE A



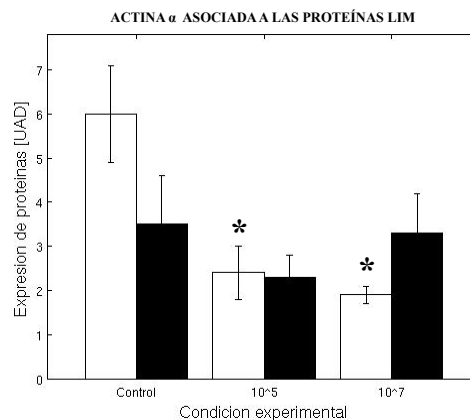
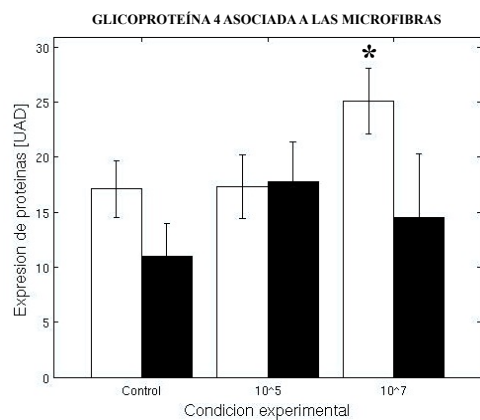
## A. NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO

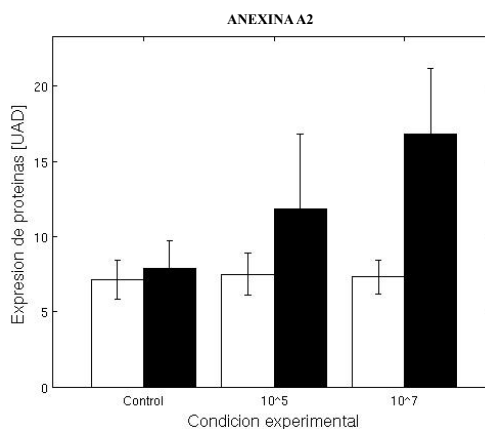
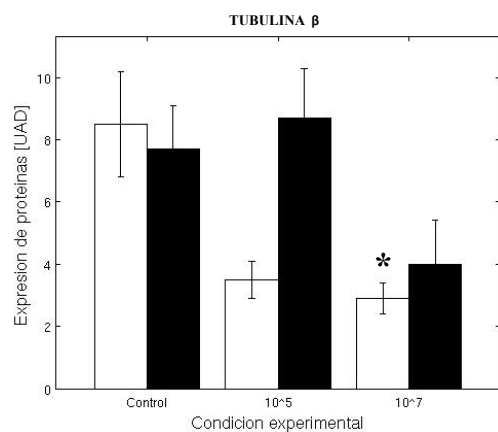
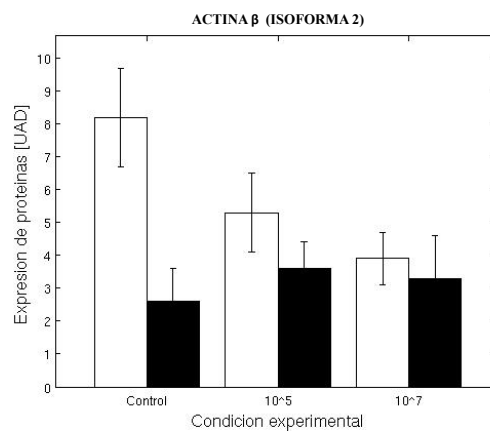
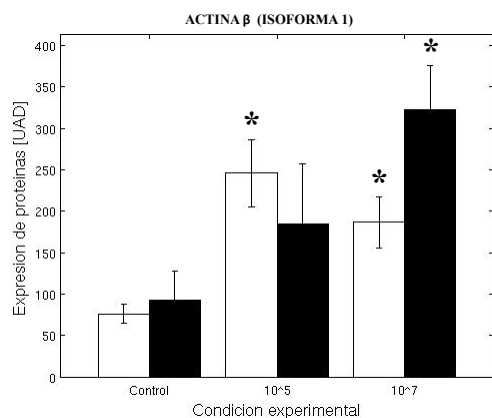
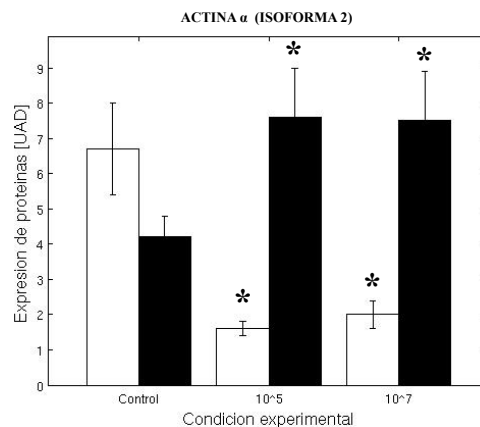
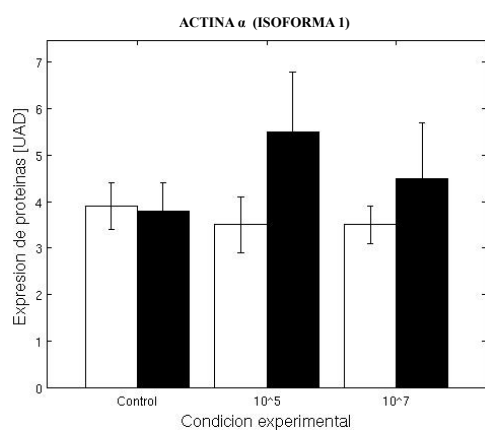
Diagramas de barras de la expresión de las proteínas del citoesqueleto y sistema contráctil de la pared vascular sana (barra blanca) y coincubada con  $\text{TNF-}\alpha$  (barra negra) en la pared vascular control y tras la incubación con PRP.

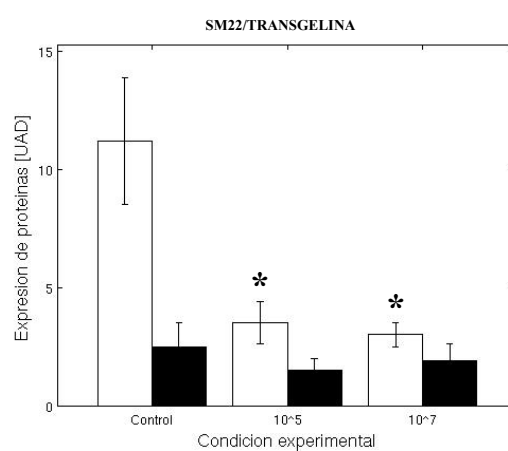
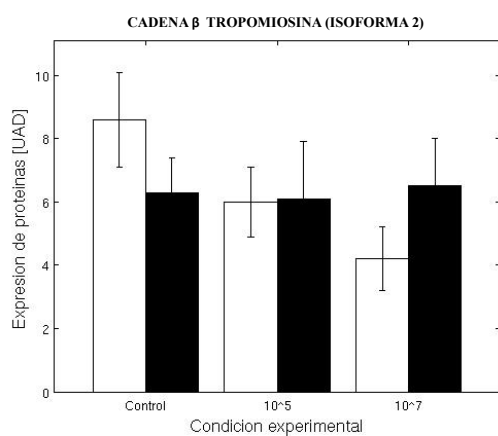
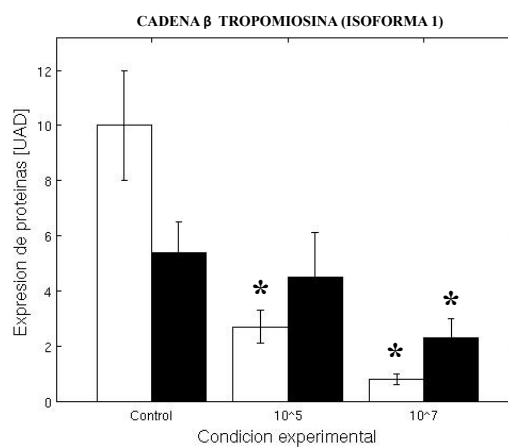
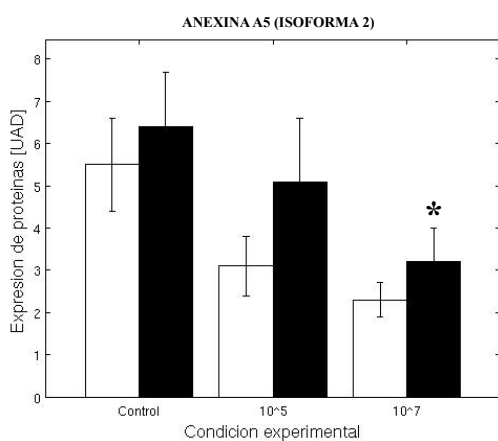
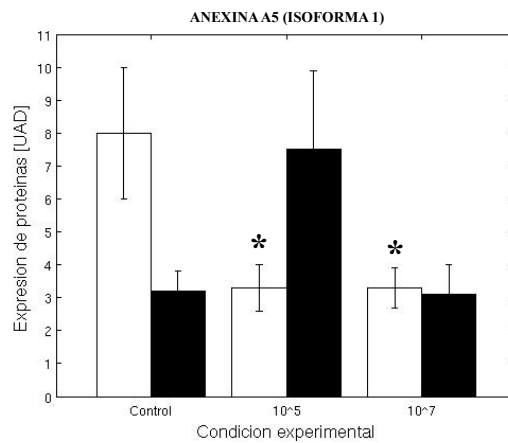
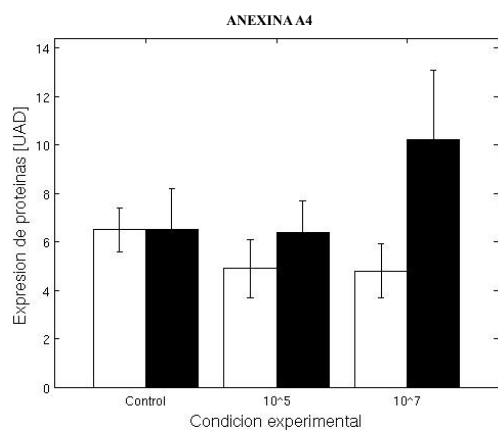
UAD: Unidades arbitrarias de densitometría.  $10^5$ : concentración plaquetaria de  $10^5$  plaquetas/pocillo.

$10^7$ : concentración plaquetaria de  $10^7$  plaquetas/pocillo.

\*  $p \leq 0.05$ .









---

## **APÉNDICE B**





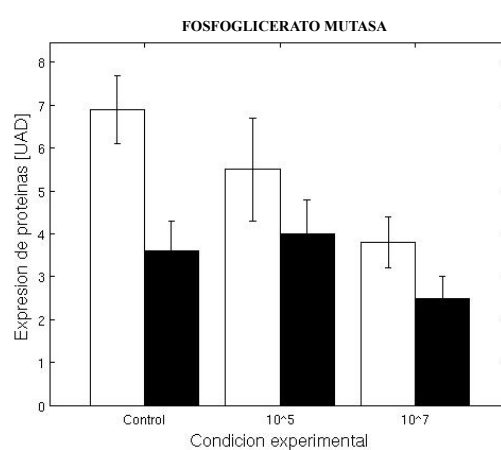
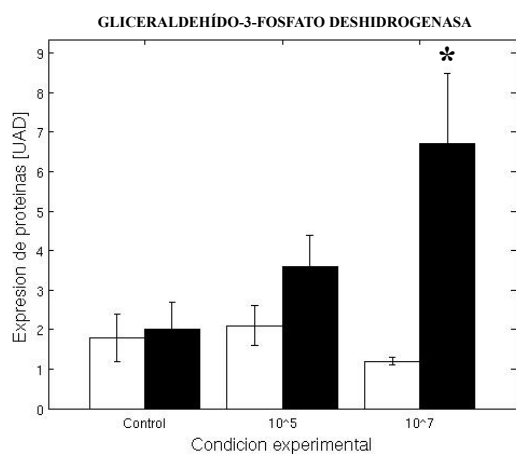
## B. NIVELES DE EXPREISÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

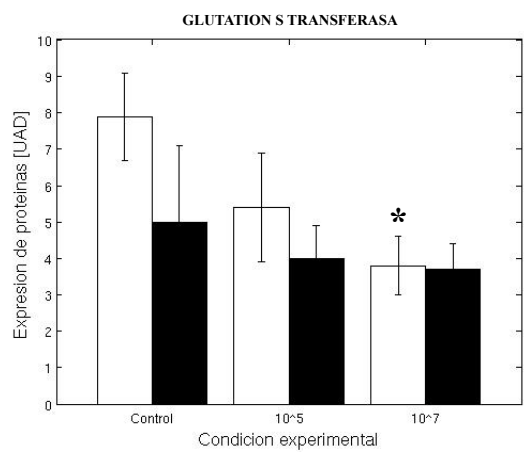
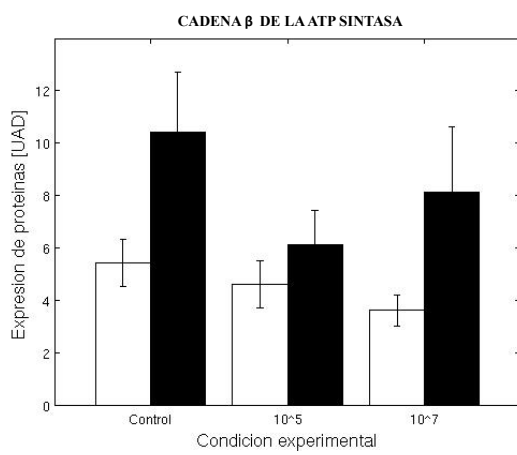
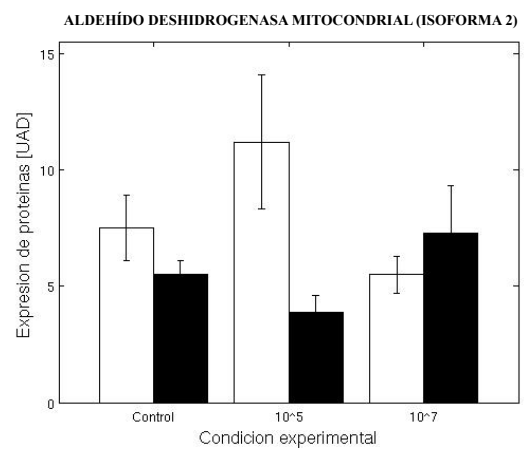
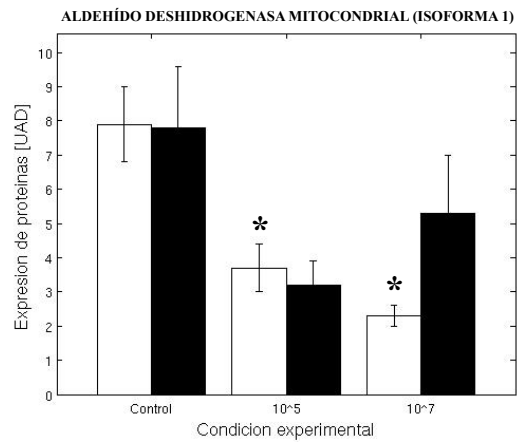
Diagramas de barras de la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético de la pared vascular sana (barra blanca) y coincubada con  $\text{TNF-}\alpha$  (barra negra) en la pared vascular control y tras la incubación con PRP.

**UAD:** Unidades arbitrarias de densitometría.  **$10^5$ :** concentración plaquetaria de  $10^5$  plaquetas/pocillo.

**$10^7$ :** concentración plaquetaria de  $10^7$  plaquetas/pocillo.

\*  $p \leq 0.05$ .





---

## APÉNDICE C



## C. ABREVIATURAS

**2-DE:** Electroforesis bidimensional

**AA:** Ácido araquidónico

**ACD:** Ácido citrato dextrosa

**ADH<sub>m</sub>:** Aldehído deshidrogenasa mitocondrial

**ADP:** Adenosín difosfato

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BCA:** Ácido bicinconínico

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CD40L:** CD40 ligado

**CE:** Célula endotelial

**CHAPS:** 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propenosulfonato

**CML:** Célula de músculo liso

**DHAP:** Dihidroxiacetona fosfato

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DO:** Densidad óptica

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** *Enzyme linked immunosorbent assay*

**eNOS:** Enzima óxido nítrico sintasa endotelial

**F6P:** Fructosa 6 fosfato

**FT:** Factor tisular

**G3P:** Gliceraldehído 3 fosfato

**G3PDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**G6P:** Glucosa 6 fosfato

**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

**GP Ib:** Glicoproteína Ib plaquetaria

**GP IIb/IIIa:** Glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria

**ICAM:** Molécula de adhesión intercelular-1

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IL-1:** Interleuquina-1

**IL-6:** Interleuquina-6

**IL-8:** Interleuquina-8

**IL-10:** Interleuquina-10

**iNOS:** Óxido nítrico sintetasa inducible

**IPG:** Gradiente de pH inmovilizado

**I $\kappa$ B:** Inhibidor kappa beta

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**LDL<sub>ox</sub>:** Lipoproteínas oxidadas de baja densidad

**MCP-1:** Proteína quimiotáctica de monocitos 1

**M-CSF:** Factor de crecimiento estimulante de colonias de macrófagos

**MMP:** Metaloproteinasas de matriz

**MS:** Espectrometría de masas

**NAD:** Nicotinamida adenín dinucleótido

**NADH:** Nicotinamida adenín dinucleótido reducido

**NF- $\kappa$ B:** Factor de transcripción nuclear kappa beta

**NO:** Óxido nítrico

**PBS:** Tampón fosfato-salino

**PCR:** Proteína C reactiva

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

**PLT:** Plaquetas

**PPP:** Plasma pobre en plaquetas

**PRP:** Plasma rico en plaquetas

**PVDF:** Polifluoruro de vinilideno

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute*

**SDS-PAGE:** Gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS

**SFB:** Suero fetal bovino

**TBS-T:** *Tris-Buffered saline Tween-20*

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TOF:** *Time of flight*

**TPI:** Triosa fosfato isomerasa

**TxA<sub>2</sub>:** Tromboxano A<sub>2</sub>

**UAD:** Unidades arbitrarias de densitometría

**VCAM-1:** Molécula 1 de adhesión vascular

**vWF:** Factor de *von Willebrand*

**WB:** *Western blot*

**w/v:** Weight/volume



---

## **APÉNDICE D**



## **D. ABSTRACT**

### **BACKGROUND**

Although much is known about the effects of the vascular wall on platelets, studies examining the effect of platelets on the expression of proteins in the vascular wall are sparse. Platelets are source of several mediators including growth factors and other substances that may influence the expression of proteins in the vascular wall. In this regard, *in vitro* studies have suggested that platelets may induce inflammation on endothelial culture.

Until now, it has been difficult to monitor changes in the expression of several proteins at the same time in a single sample. A technology termed as proteomics, which it is based in the use of two dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry (MS) analysis has emerged providing us a useful methodology to quantify and identify changes in the expression of multiple proteins and proteins isotypes in a single sample.

### **OBJECTIVES**

The aim of the present study was then to analyze, using proteomics, whether platelets may modified the expression of proteins in the vascular wall particularly those associated with vascular cytoskeleton and energetic metabolism. For this purpose, we used an *in vitro* model coincubating platelet rich plasma with isolated healthy aortic segments and with aortic segments submitted to a pre-inflammatory situation prior to be coincubated with the platelets.

## MATERIALS AND METHODS

We analyzed whether platelets may modify the protein expression in the vascular wall. We used an in vitro model coincubating human platelet rich plasma (PRP) with control and 10 ng/ml TNF- $\alpha$ -preincubated bovine aortic segments. Two different platelet concentrations ( $10^5$  and  $10^7$  platelets/well) were used in the coincubation experiments. The coincubation system was prepared by placing sterile Transwell-COL (Corning incorporated, COSTAR 3491, NY) inserts of 24 mm diameter and 0.4 mm pore size, containing the platelets, into wells containing the bovine aortic segments. 2-DE, MS and western blot analysis were used to determine changes in the expression of proteins associated with the cytoskeleton and energetic metabolism in the aortic segments. In the bovine aortic proteomic map the spots were densitometrically analyzed and identified by comparison with those found in the human saphenous vein. The spots in which statistical differences were observed were further identified by MS. The enzymatic activity was determined in the vascular wall following the method described by Misset and Opperdoes. The content of pyruvate present in the bovine aortic segments was also quantified using a Pyruvate Assay Kit(K609-100, BioVision Research Products, USA).

## RESULTS

In control healthy vascular wall, only the cytoskeleton-related proteins expression was modified by PRP. However, when PRP was coincubated with TNF- $\alpha$  pre-stimulated aortic segments lesser number of cytoskeleton-related proteins were modified. With respect to energetic metabolism, in control segments PRP failed to modify any of the analyzed energetic-related proteins. However, in TNF- $\alpha$ -preincubated segments the presence of PRP upexpressed glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. Moreover,

by western blot experiments it was observed that in TNF- $\alpha$ -preincubated segments the expression of fructose 1,6-bisphosphate aldolase was downregulated by platelets. However, no differences were found in the expression of triosephosphate isomerase and ATP synthase  $\alpha$ -chain. In addition, the activity of fructose 1,6-bisphosphate aldolase and piruvate content was significantly reduced without modification on triosephosphate isomerase activity.

## **CONCLUSIONS**

The main finding of the present study was that in the control vascular wall platelets by themselves affected the expression of a number of proteins associated with contractile system and the energetic metabolism. However, under vascular pre-inflammatory state, platelets modified the expression of a lesser number of proteins associated with contractile system and energetic metabolism. The crosstalk between platelets and vascular wall is bidirectional and platelets regulated in the vascular wall the expression of proteins associated with the cytoskeleton and energetic metabolism, particularly in the healthy vascular wall. Therefore, the present study provides new evidences about the main implication of platelets in the regulation of the expression of vascular proteins particularly under healthy and inflammatory vascular conditions which they may have importance in the setting of ischemic processes.

